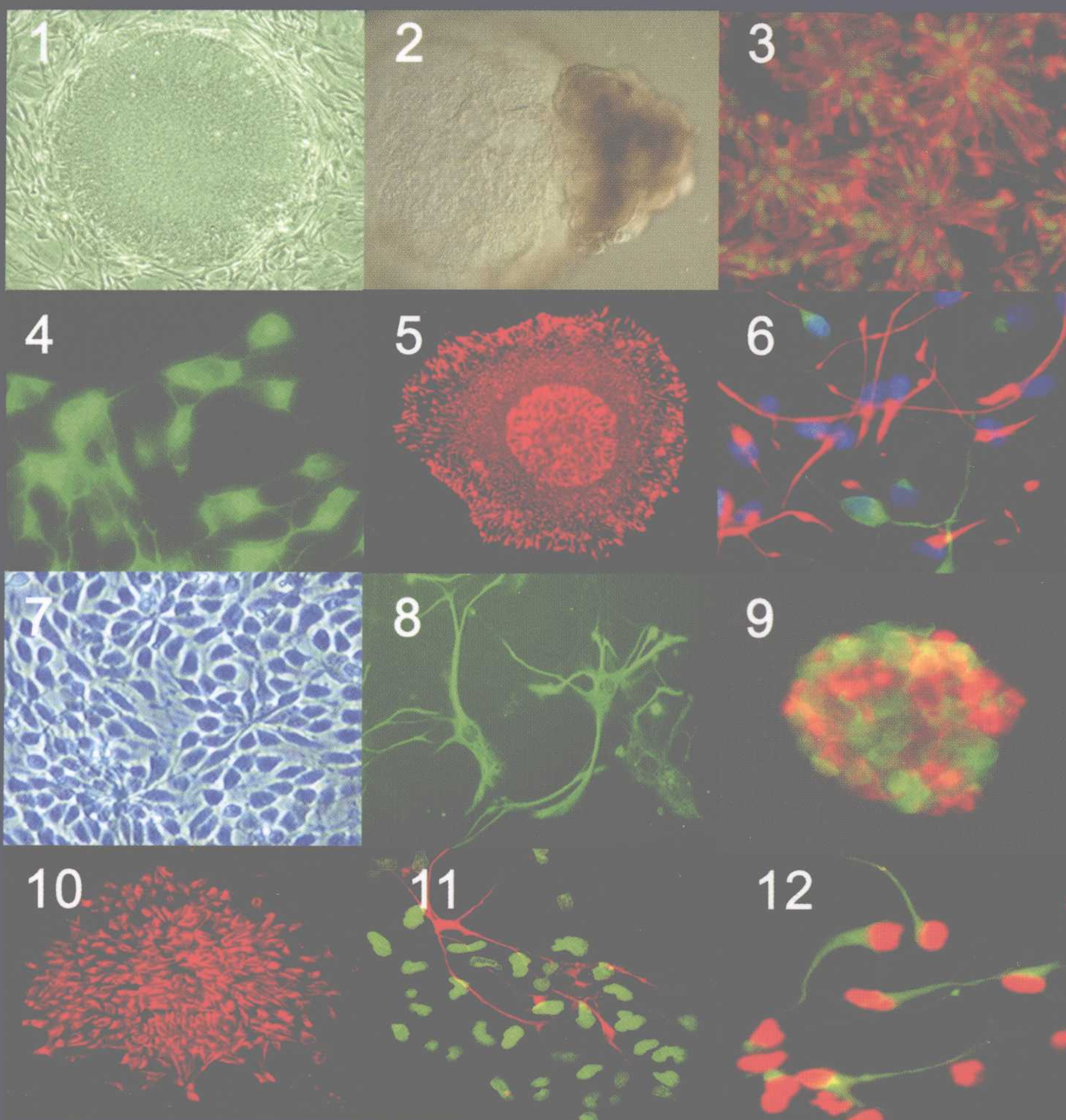


生命科学实验指南系列

现代细胞生物学技术

Advanced Technologies in Cell Biology

辛 华 主 编
马 午 副主编





科 学 出 版 社
www.sciencep.com

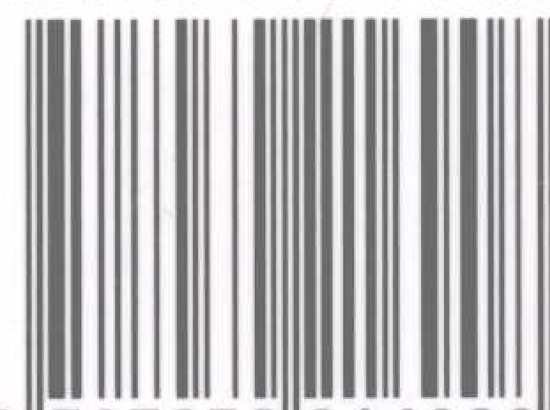
(Q—2087.0101)



生命科学实验指南系列（“十一五”国家重点图书出版规划）

封面图注释：

1. 人胚胎干细胞集落；
2. 胚胎干细胞分化成的类胚体；
3. 人胚胎干细胞类胚体贴壁后显示出的花饰状神经外胚细胞群。用免疫荧光细胞化学染色后细胞群显示 sox1（绿色）/nestin（红色）阳性；
4. 花饰状神经外胚细胞分化成TuJ1阳性的人神经元；
5. 人类胚胎干细胞分化成神经祖细胞群显示nestin 阳性；
6. 大鼠胚胎脑神经干细胞和祖细胞贴壁培养后显示nestin阳性（红色），神经元显示MAP2 阳性（绿色），细胞核DAPI染色（蓝色）；
7. 贴壁法体外培养的大鼠神经祖细胞；
8. 生长在胶原蛋白支架里的神经干细胞和祖细胞分化成GFAP阳性的星型胶质细胞；
9. 用悬浮法体外培养的大鼠神经球显示nestin 阳性的神经祖细胞（红色）和MAP2阳性神经元（绿色）；
10. 人类胚胎干细胞分化成nestin 阳性神经祖细胞；
11. 大鼠胚胎脑神经干细胞分化成TuJ1阳性神经元（红色）和正在合成DNA的神经干细胞（BrdU掺入的阳性核显绿色）；
12. 大鼠胚胎脑神经干细胞分化成TuJ1阳性神经元（绿色）和细胞核PI染色（红色）。

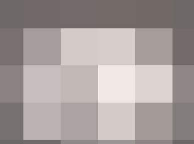

ISBN 978-7-03-021690-8
9 787030 216908 >



生物分社
联系电话：010-64012501
http://www.lifescience.com.cn
e-mail:lifescience@mail.sciencep.com

销售分类建议：生物医学/细胞生物学

定 价：55.00 元



现代细胞生物学技术

Advanced Technologies in Cell Biology



























生命科学实验指南系列

Advanced Technologies in Cell Biology

现代细胞生物学技术

主　编　辛　华

副主编　马　午

科学出版社

北　京

内 容 简 介

本书为高等院校研究生学习细胞生物学技术用书，全书共12章，涵盖了细胞生物学经典实验方法和当今细胞生物学的一些新技术、新方法，既可用于研究生细胞生物学技术教学，又可作为细胞生物学技术工具书使用。

本书编入实验共119个，内容涉及研究显微镜与显微图像分析技术、电子显微镜技术、细胞化学技术（细胞化学、酶、免疫、荧光细胞化学）、细胞培养技术、培养细胞凋亡检测技术、细胞融合技术、细胞与细胞器的分离技术、细胞的原位杂交技术、流式细胞术、真核细胞基因转染与表达技术、哺乳动物基因敲除技术和干细胞与组织工程技术等内容。

本书对每个实验项目的原理、技术方法及注意事项都有充分的阐述，并附有大量彩色显微照片，以加深感性认识。本书注重体现理论意义和实际应用价值，适用于生物学、医学、农学、师范院校的教师、研究生以及科研人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

现代细胞生物学技术/辛华主编. —北京：科学出版社，2008
(生命科学实验指南系列)
ISBN 978-7-03-021690-8

Ⅰ.现… Ⅱ.辛… Ⅲ.细胞生物学-实验-指南 Ⅳ.Q2-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第055458号

责任编辑：李 悦 沈晓晶/责任校对：何艳萍
责任印制：钱玉芬/封面设计：耕者设计工作室

科学出版社出版
北京东黄城根北街16号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com

源海印刷有限责任公司印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009年1月第 一 版 开本：787×1092 1/16
2009年1月第一次印刷 印张：19 3/4 插页：6
印数：1—2 500 字数：451 000

定价：55.00元

（如有印装质量问题，我社负责调换〈环伟〉）

《现代细胞生物学技术》编委会

主　编　辛　华
副主编　马　午

编　委（按姓氏笔画排列）

马　午　王晓静　卞继峰　朱长军　朱庆均　李伯勤
李炳生　李　霞　吴晓东　辛　华　杨　勇　邵红莲
苑辉卿　周永兴　赵　玲　盖　慧　訾晓渊

本书主要参编人员：

马　午　美国 ATCC 发育生物学与干细胞研究中心
李炳生　美国国立卫生研究院（NIH）神经病学与中风研究所
侯　陵　美国国立卫生研究院（NIH）人类基因组学研究所
周永兴　美国国防医科大学（Uniformed Services University of the Health Sciences）解剖生理遗传教研室
李绍巍　美国国防医科大学（Uniformed Services University of the Health Sciences）皮肤科研究室
单　良　美国霍华德大学（Howard University）放射医学研究室
顾卫红　北京中日友好医院神经内科遗传实验室
吴晓东　中国科学院研究生院
訾晓渊　第二军医大学细胞生物学教研室
盖　慧　上海市发育生物学重点实验室
胡晓燕　山东大学医学院生物化学与分子生物学研究所
苑辉卿　山东大学医学院生物化学与分子生物学研究所
刘师莲　山东大学医学院生物化学与分子生物学研究所
卞继峰　山东大学医学院生物化学与分子生物学研究所
王旭平　山东大学教育部、卫生部心血管重构与功能研究重点实验室
李　栋　山东大学齐鲁医院低温医学研究室
车大年　原山东医科大学细胞生物学教研室
赵　玲　山东大学医学院神经生物学研究所
杨　勇　山东中医药大学基础医学院
朱庆均　山东中医药大学基础医学院

朱长军　山东大学医学院细胞生物学研究所
辛　华　山东大学医学院细胞生物学研究所
王晓静　山东大学医学院细胞生物学研究所
李　霞　山东大学医学院细胞生物学研究所
邵红莲　山东大学医学院细胞生物学研究所
李伯勤　山东大学医学院组织胚胎学研究所
孙　涛　山东大学医学院细胞生物学研究所
刘　瑶　山东大学医学院细胞生物学研究所
刘鲁华　山东大学医学院细胞生物学研究所
逯素梅　山东大学医学院细胞生物学研究所

前　言

细胞生物学是所有生命科学的重要基础学科。近二十多年来，细胞生物学发展迅速，其研究成果广泛应用于生命科学各领域，成为现代生命科学的核心学科之一。掌握现代细胞生物学实验技术和研究方法，对于从事生命科学基础研究和应用研究是十分必要的。

随着分子生物学等学科的迅速发展和渗透，细胞生物学的研究范畴不断拓展，内容不断深化，新技术、新方法不断涌现，推动着生命科学迅速发展。为了适应当今研究生、教师和科研工作者的需要，我们总结了参编人员十多年来细胞生物学实验教学和科研工作经验，在2001年出版的《细胞生物学实验》（科学出版社）基础上，进行了重新编写，保留了部分常用经典实验，补充了大量当前常用的细胞生物学新技术和新方法，力求保持本书的先进性、可行性和实用性。由于本书定位于既可作为研究生《细胞生物学技术》课程教材，又可作为高等院校教师、科研人员以及广大研究生的实验工具书，因此编入的实验方法是当前研究生科研工作中应用较多并具有一定先进性的实验方法，所选入的技术方法和实验材料力求体现简易方便、多样性和多层次性。本书适用于医学院校、综合性大学、师范、农学院校的细胞生物学技术教学，也可作为教师、研究生和科研人员的参考用书。

本书共编入实验119个，内容涉及研究显微镜与显微图像分析技术、电子显微镜技术、细胞化学技术（细胞化学、酶、免疫、荧光细胞化学）、细胞培养技术、培养细胞凋亡检测技术、细胞与细胞器的分离技术、细胞融合技术、细胞的原位杂交技术、流式细胞术、真核细胞基因转染与表达技术、哺乳动物基因敲除技术和干细胞与组织工程技术等。本书对每个实验项目的实验原理、技术方法以及注意事项都有充分的阐述，还附有大量图表和彩色显微照片，图文并茂，以加深感性认识。本书注重体现理论意义和实际应用价值，编入的实验项目较多，读者可根据实验条件酌情参考。

敬请同行和专家对该书提出批评和建议，我们将在今后的教学、科研中不断补充和完善书的内容，以适应细胞生物学教学和科研的需要。

编　者
山东大学医学院细胞生物学研究所
2008年2月于济南

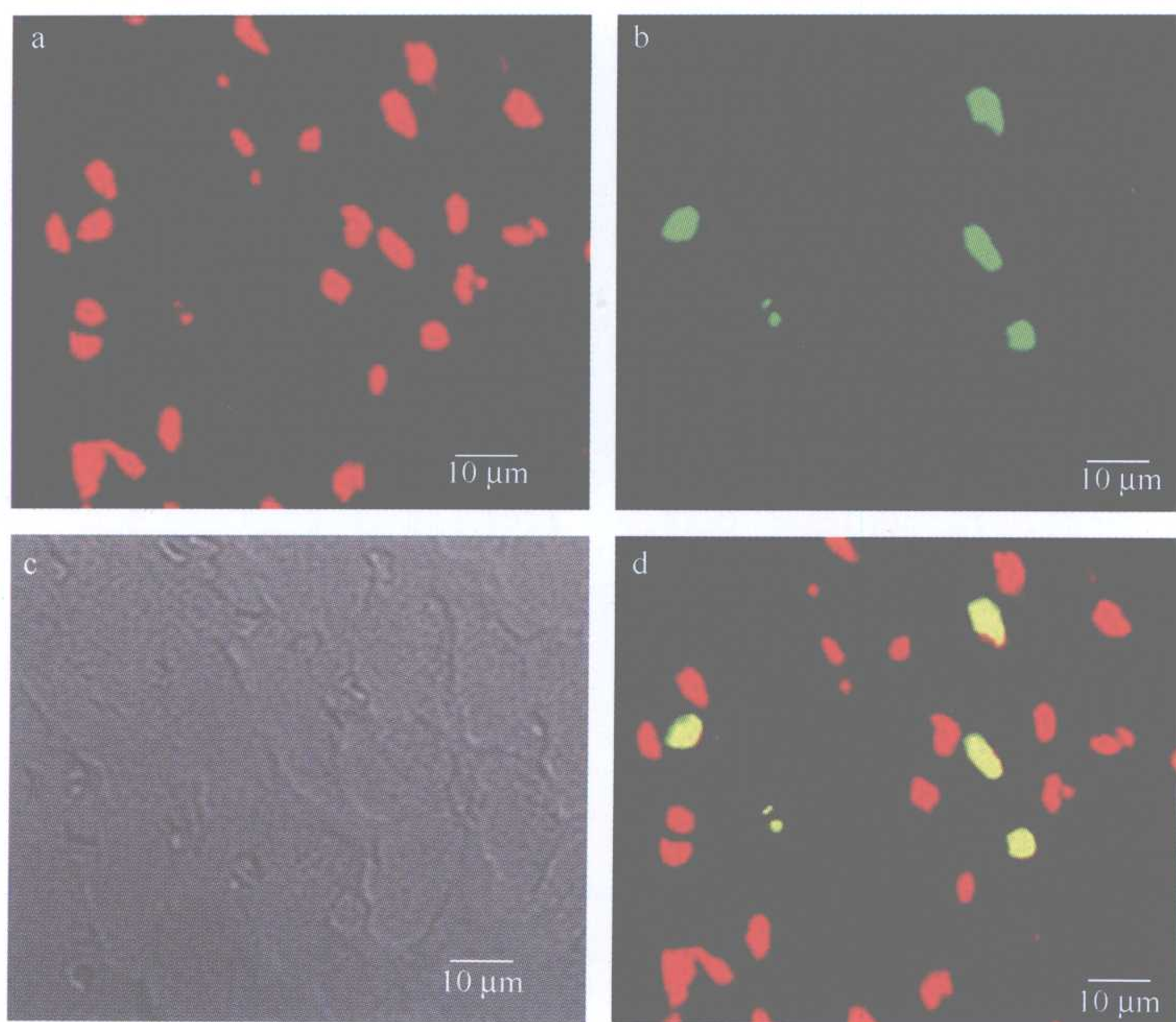


图1-10　大鼠心肌缺血再灌注TUNEL法检测心肌细胞凋亡

a. 红色荧光显示PI标记的大鼠心肌细胞核；b. 绿色荧光显示FITC标记的凋亡细胞核；c. 灰色显示透射光下大鼠心肌细胞图像；d. 显示的是图a、b的叠加图，图中黄色显示的是PI和FITC荧光叠加后的凋亡心肌细胞核

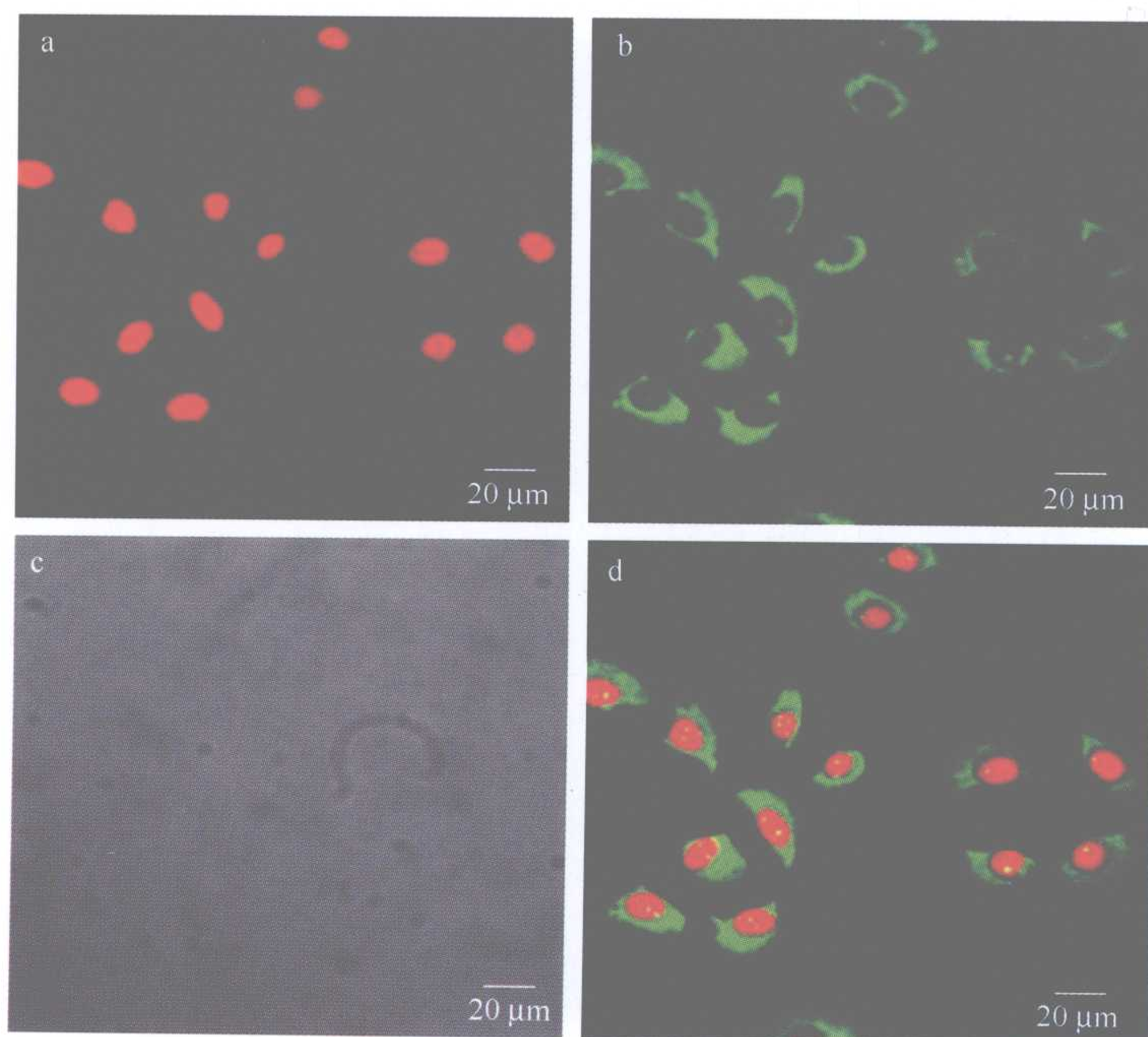


图1-11　培养的肠上皮细胞波形蛋白的表达

a. 红色荧光为PI标记的肠上皮细胞细胞核；b. 绿色荧光为FITC标记的波形蛋白；c. 灰色显示的是透射光下培养的肠上皮细胞图像；d. 显示的是图a、b的叠加图

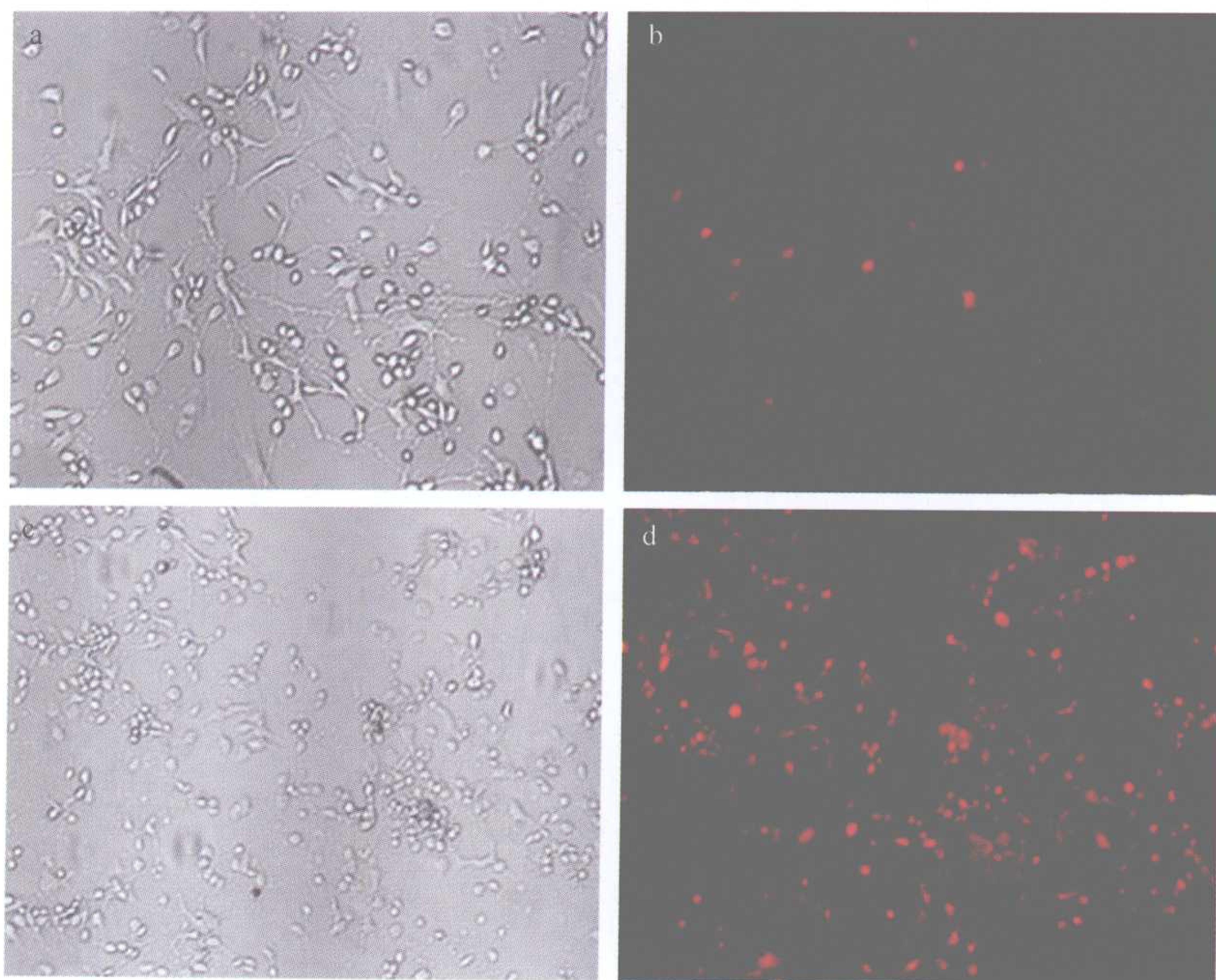


图1-12　体外培养的神经元内游离Ca^{2+}定量检测（逯素梅提供）

a. 透射光下培养的正常神经元；b. 红色荧光显示与Fluo-3 AM结合后的正常神经元内游离Ca^{2+}；c. 透射光下培养的谷氨酸作用后的神经元；d. 红色荧光显示与Fluo-3 AM结合后的Glu组神经元内游离Ca^{2+}

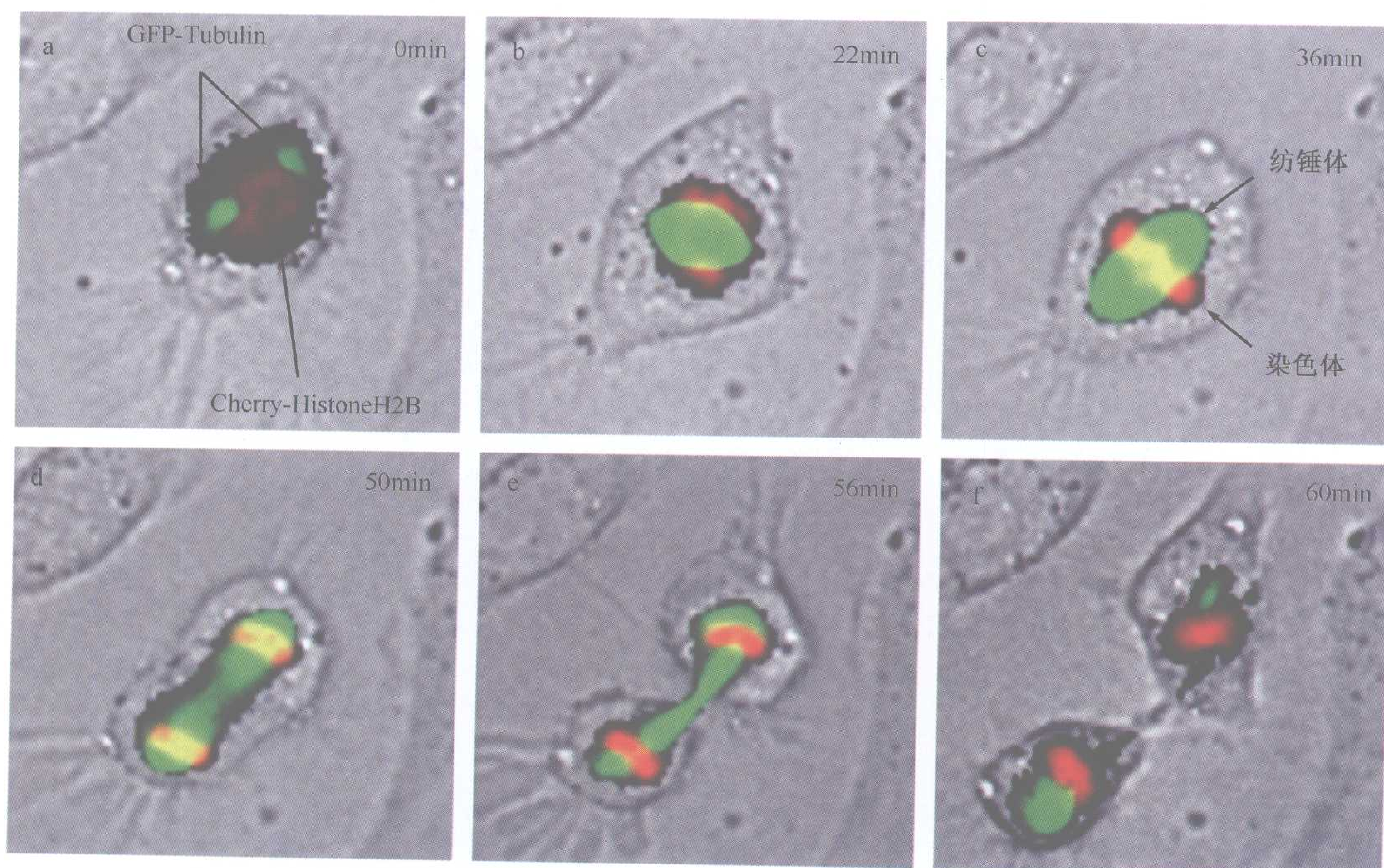


图1-16　HeLa细胞有丝分裂过程

a. 前期细胞，中心体开始向两边分离，染色质在细胞核内开始凝聚成染色体；b. 前中期细胞，微管蛋白排列成纺锤状结构，细胞核膜消失，染色体形成；c. 分裂中期细胞，出现典型的纺锤体，染色体聚集在细胞中央形成赤道板；d. 分裂后期细胞，两组染色体移向细胞两极，纺锤体拉长，染色体区间微管聚集成束，即中体（midzone）；e. 分裂末期细胞，染色体到达两极，纺锤体中央部位细胞膜凹陷，胞质分裂；f. 有丝分裂结束，两个子细胞形成，纺锤体消失，细胞核出现。细胞有丝分裂过程大约1h

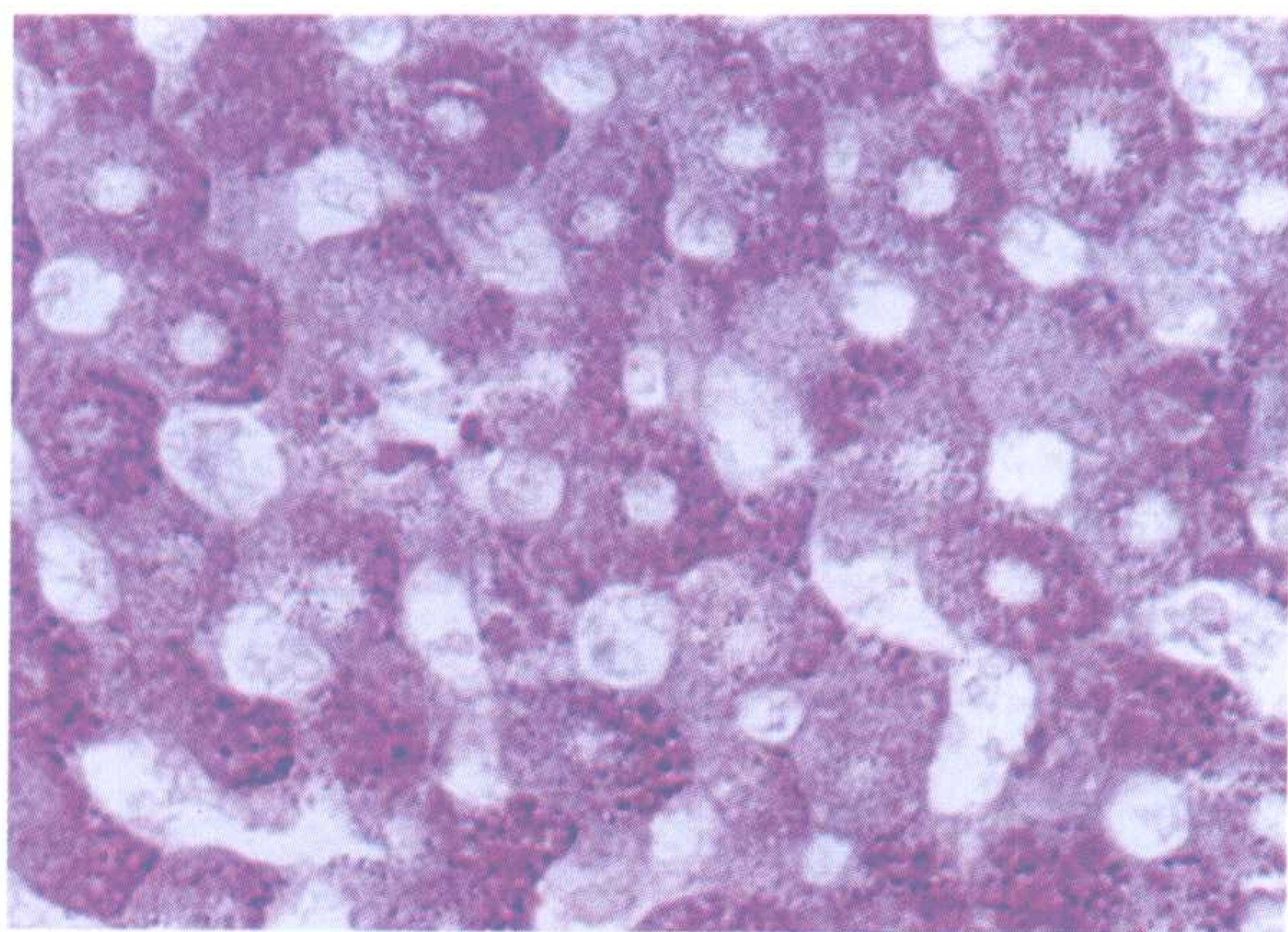


图3-5　小鼠肝切片，PAS反应显示细胞内糖原(糖原显示紫红色，高倍镜)

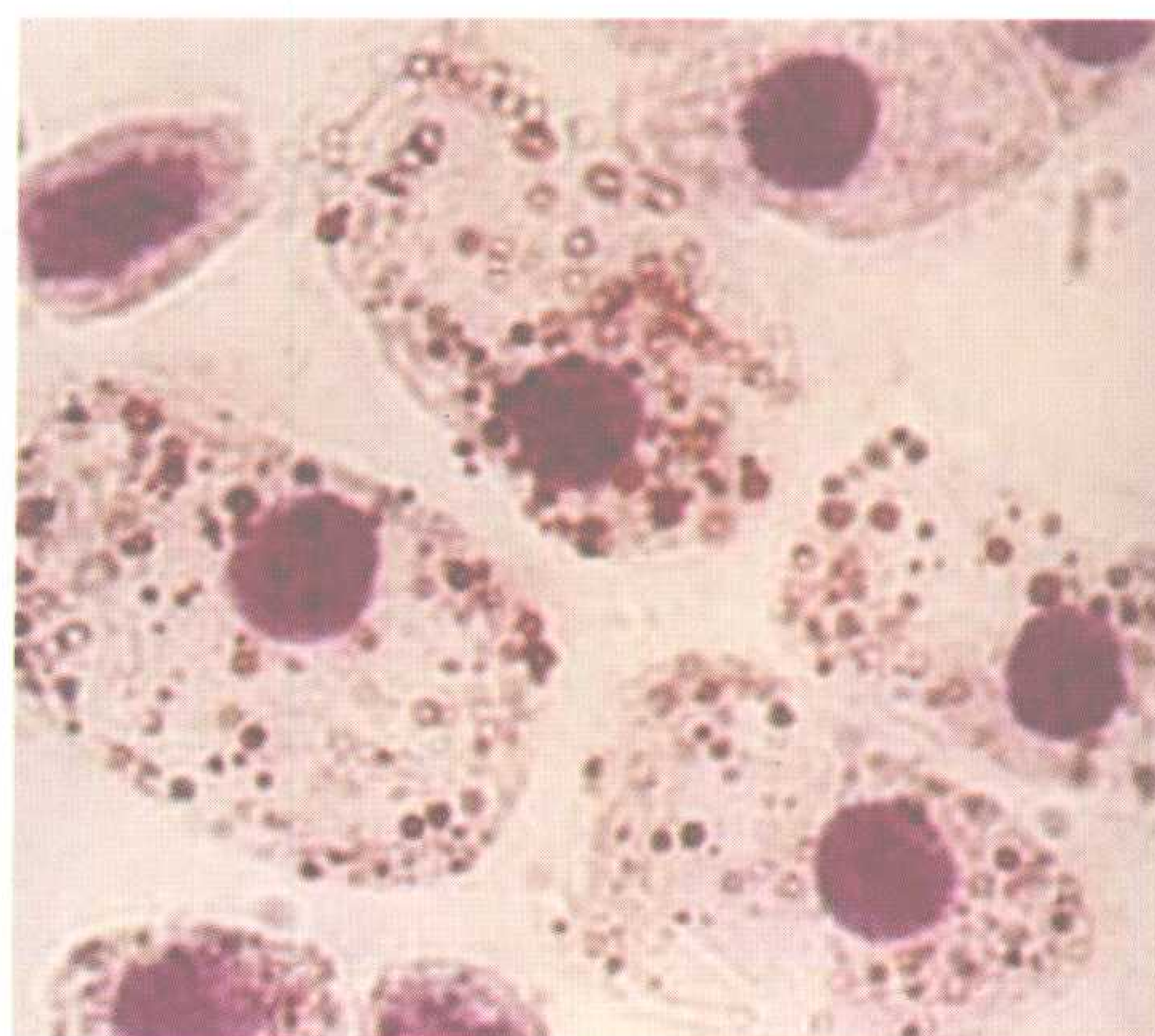


图3-6　洋葱表皮装片，苏丹Ⅲ染色显示细胞内橘黄色脂滴（细胞核用Giemsa染成紫红色）

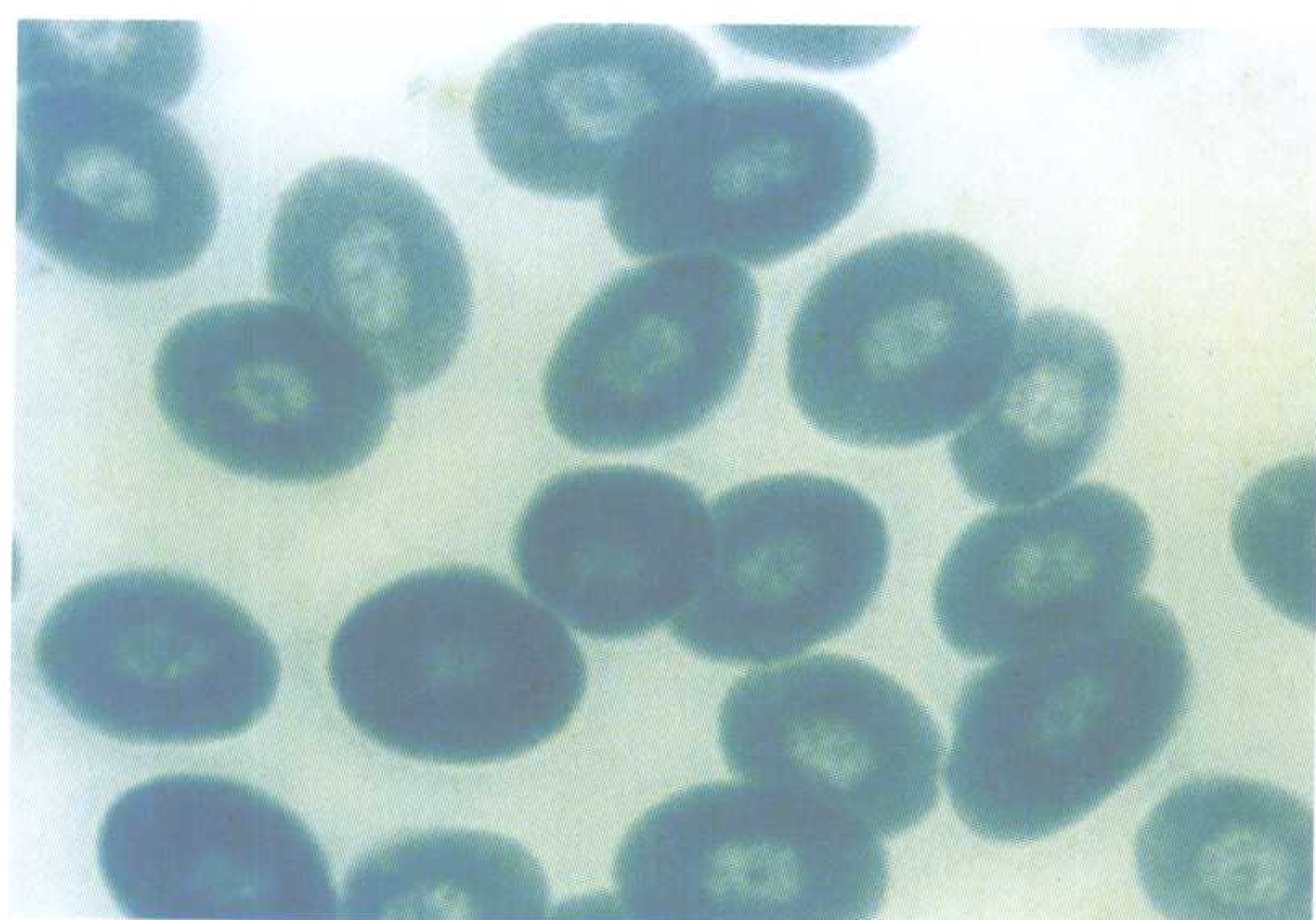


图3-7　蟾蜍血涂片，显示细胞内酸性蛋白（酸性蛋白显示绿色，主要分布于细胞质内，少量分布于细胞核内，高倍镜）

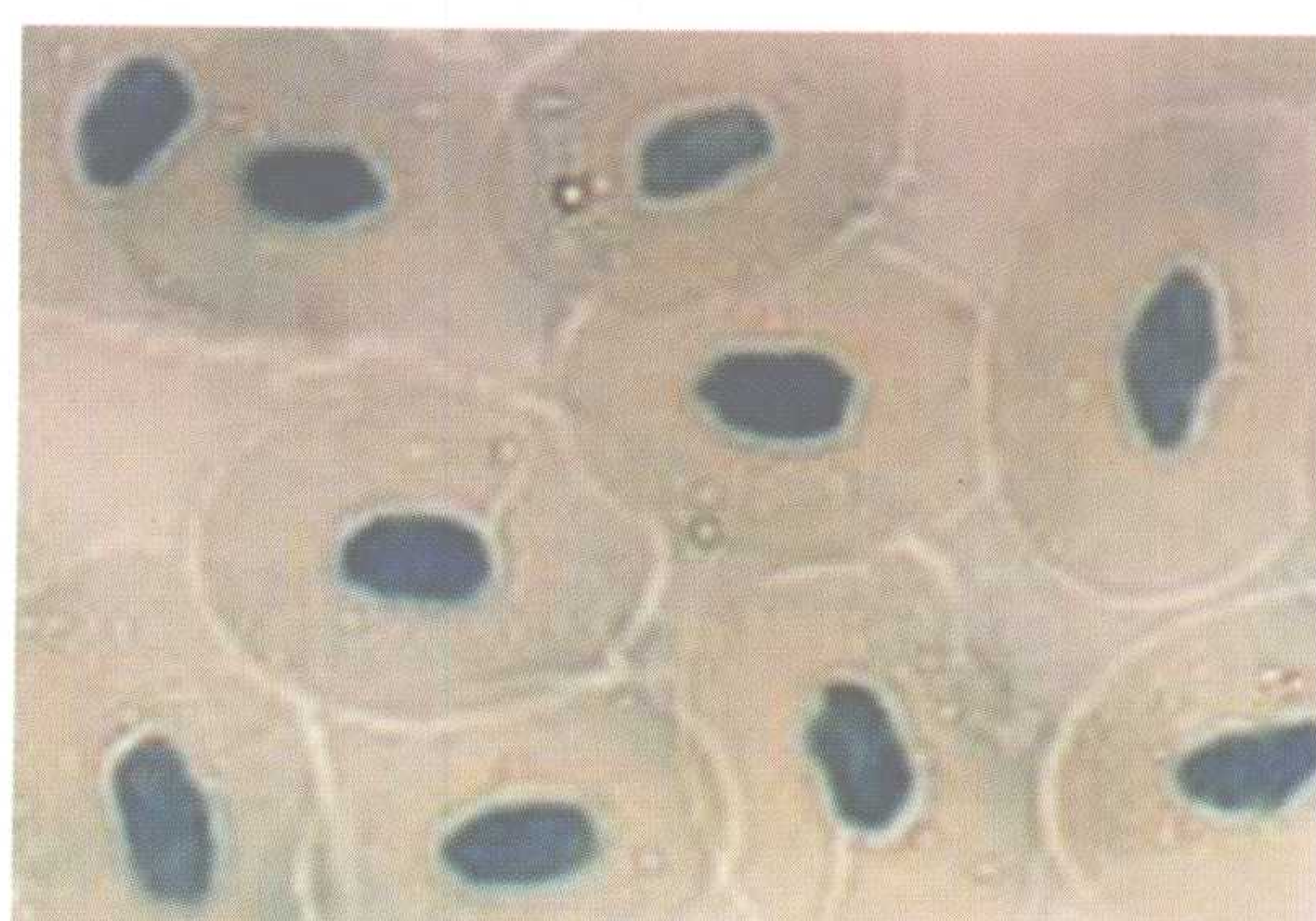


图3-8　蟾蜍血涂片，显示细胞内碱性蛋白（碱性蛋白显示绿色，分布于细胞核内，油镜）

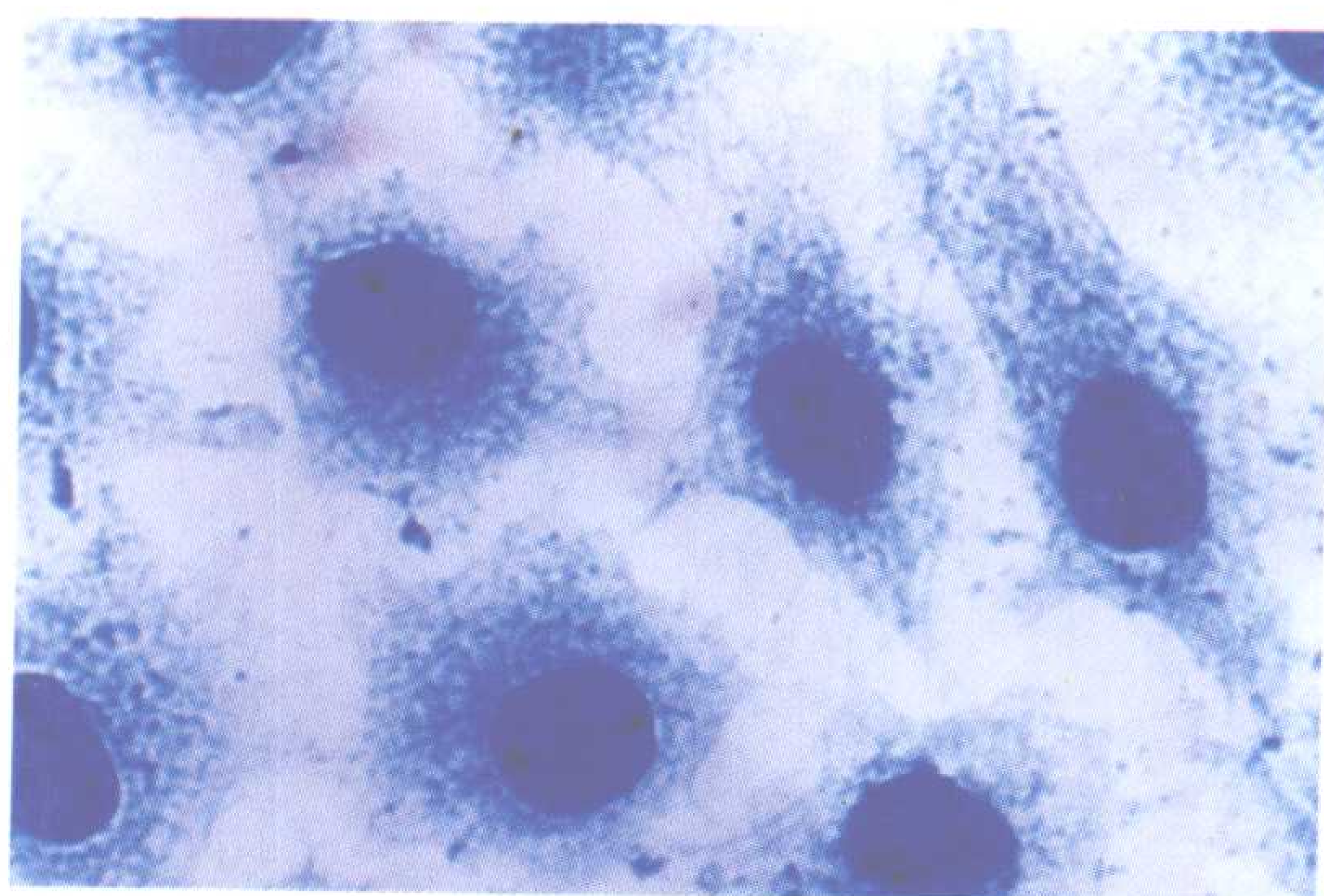


图3-9　体外培养的肝癌细胞，显示细胞内微丝束分布（分布于细胞质内，被染成蓝色，油镜）

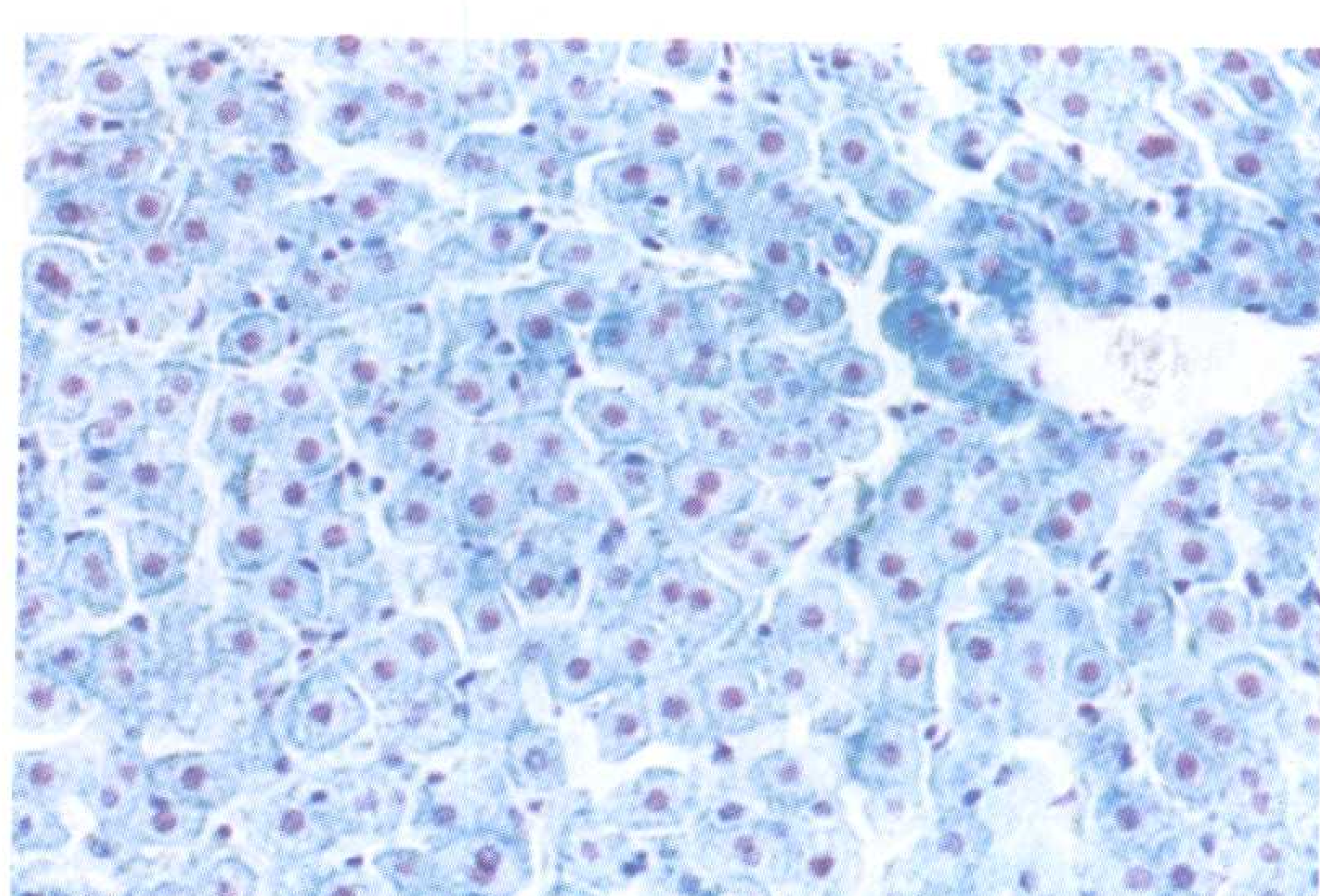


图3-10　小鼠肝切片，Feulgen反应显示细胞内DNA分布（DNA显示紫红色，亮绿复染后细胞质呈绿色，高倍镜）

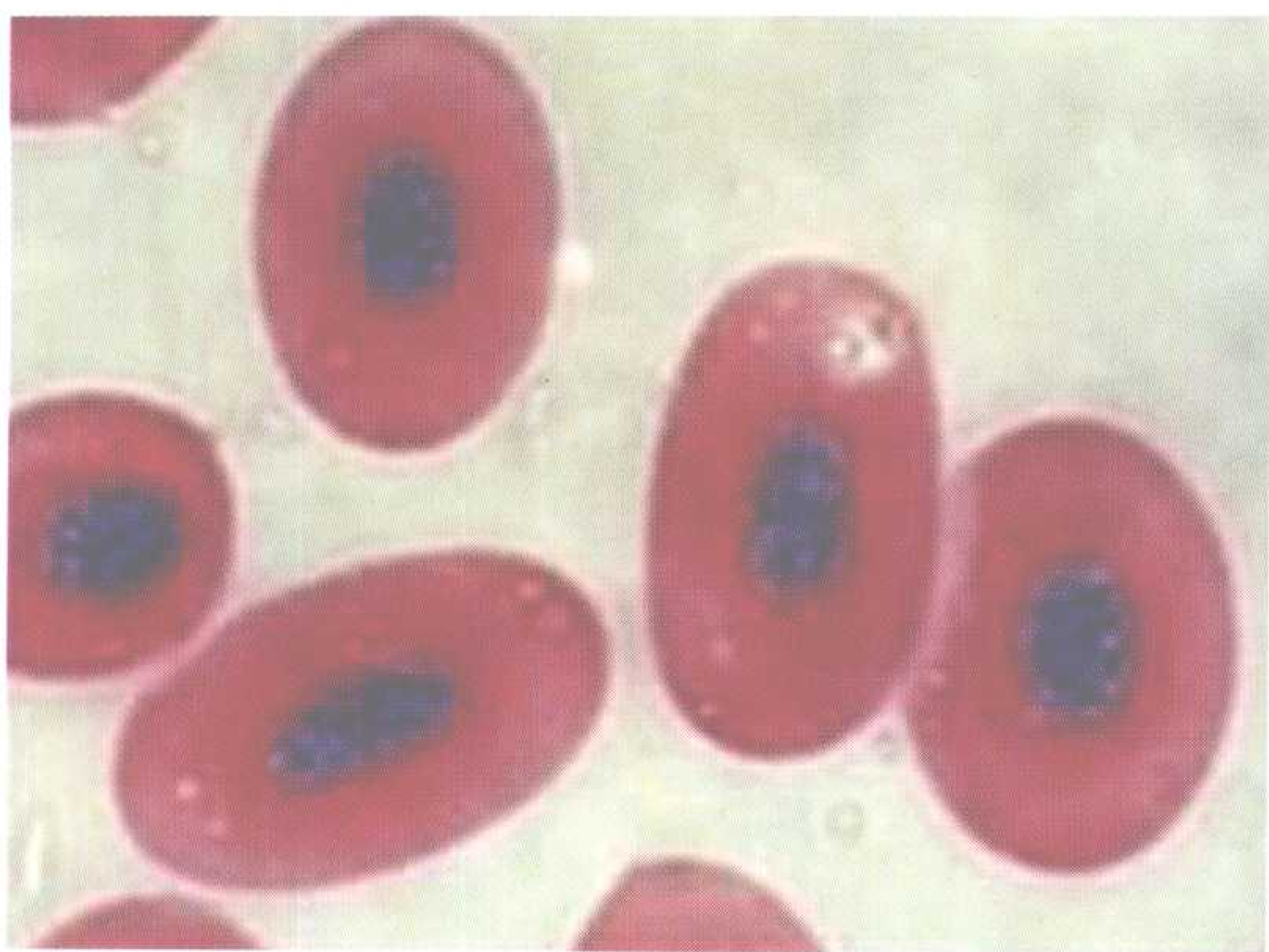


图3-12　甲基绿-派洛咛法显示蟾蜍红细胞内DNA（绿色）和RNA（红色）

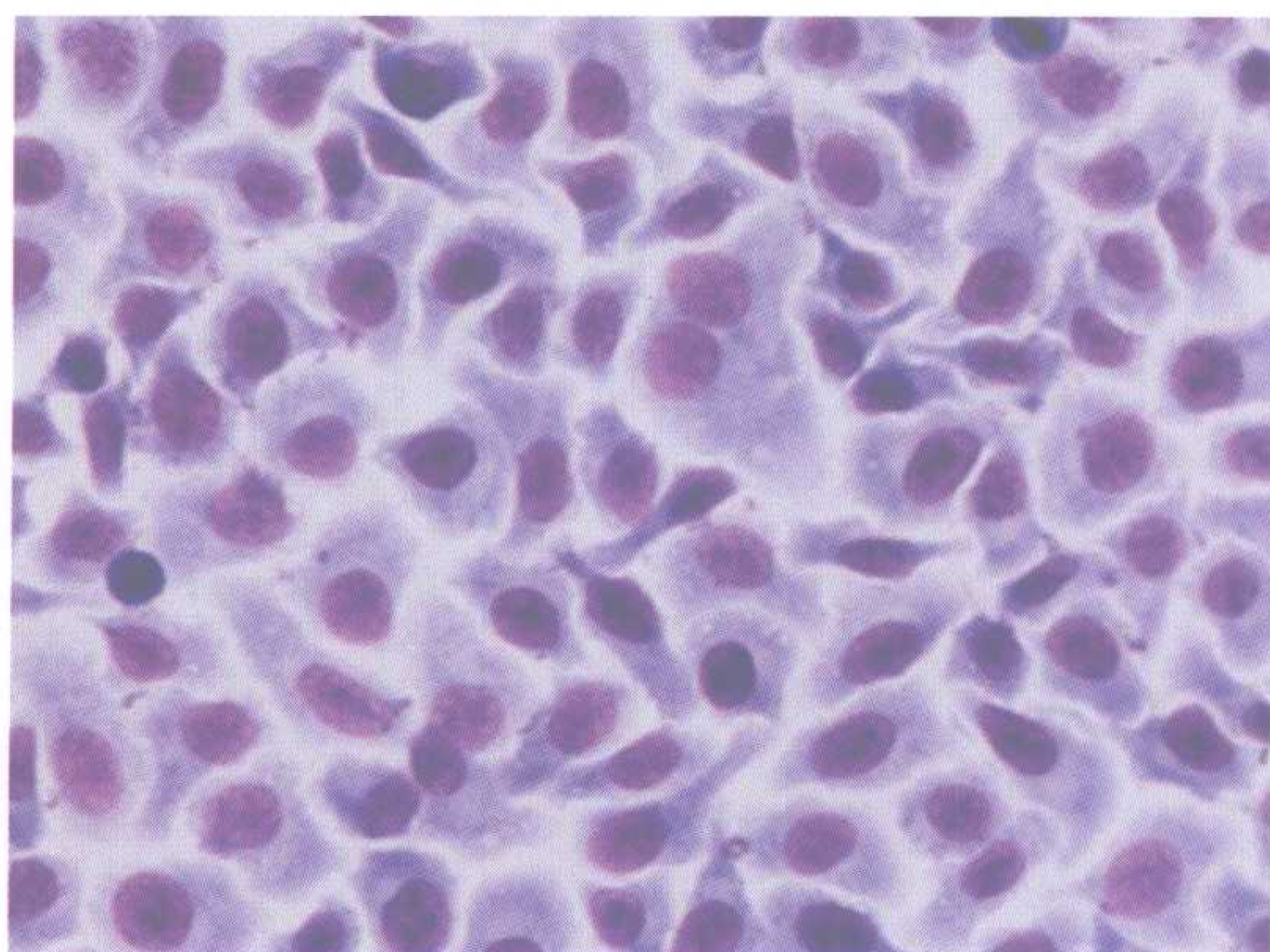


图3-13　人肝癌HepG2 细胞Giemsa染色（×200）



图3-14　蝾螈小肠绒毛上皮细胞（HE染色，高倍镜）

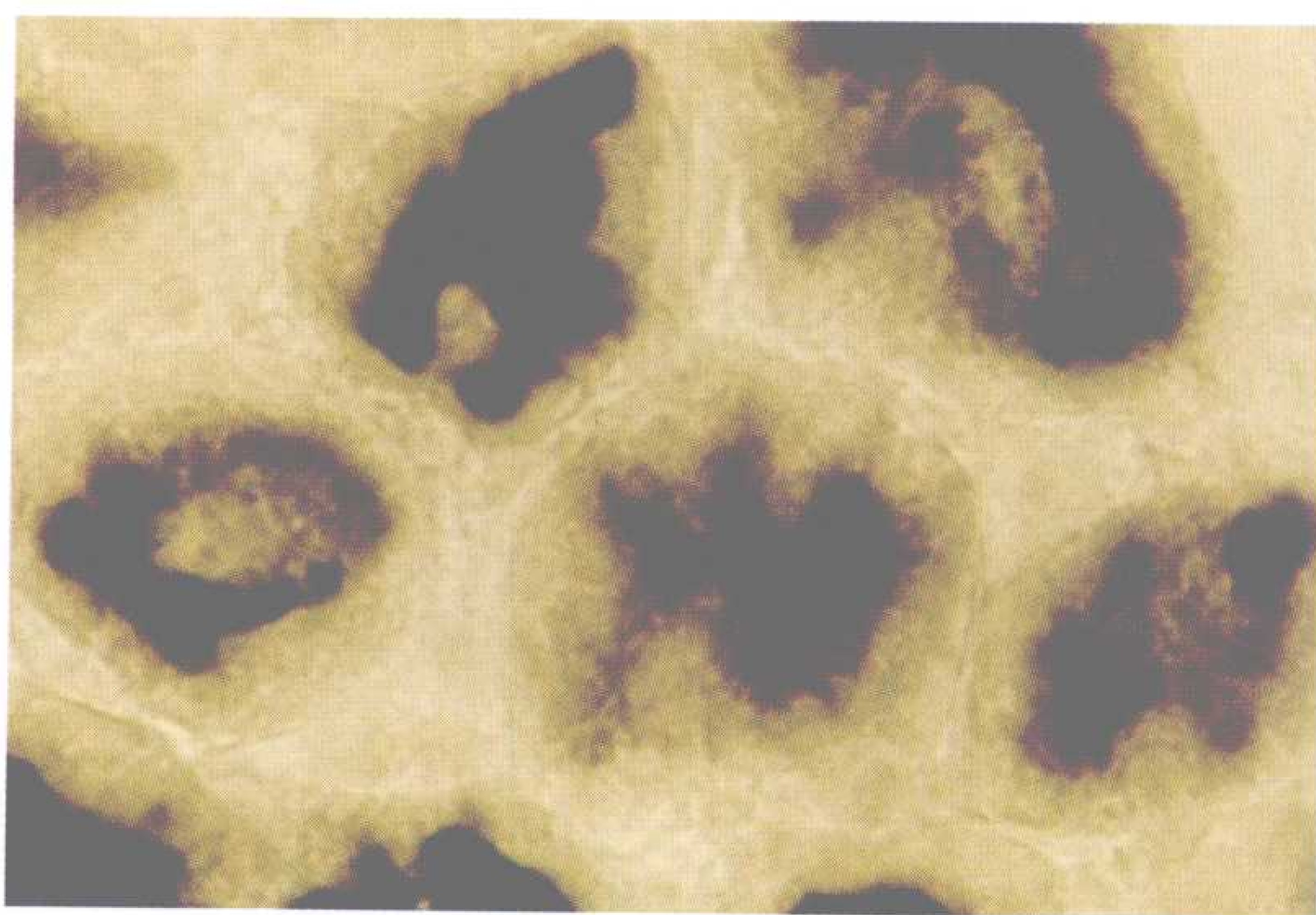


图3-16　小鼠肾组织冰冻切片显示碱性磷酸酶（黑色）



图3-17　小鼠腹腔巨噬细胞涂片显示细胞内酸性磷酸酶（油镜）



图3-18　小鼠骨髓涂片显示细胞内过氧化物酶（棕黄色，高倍镜）

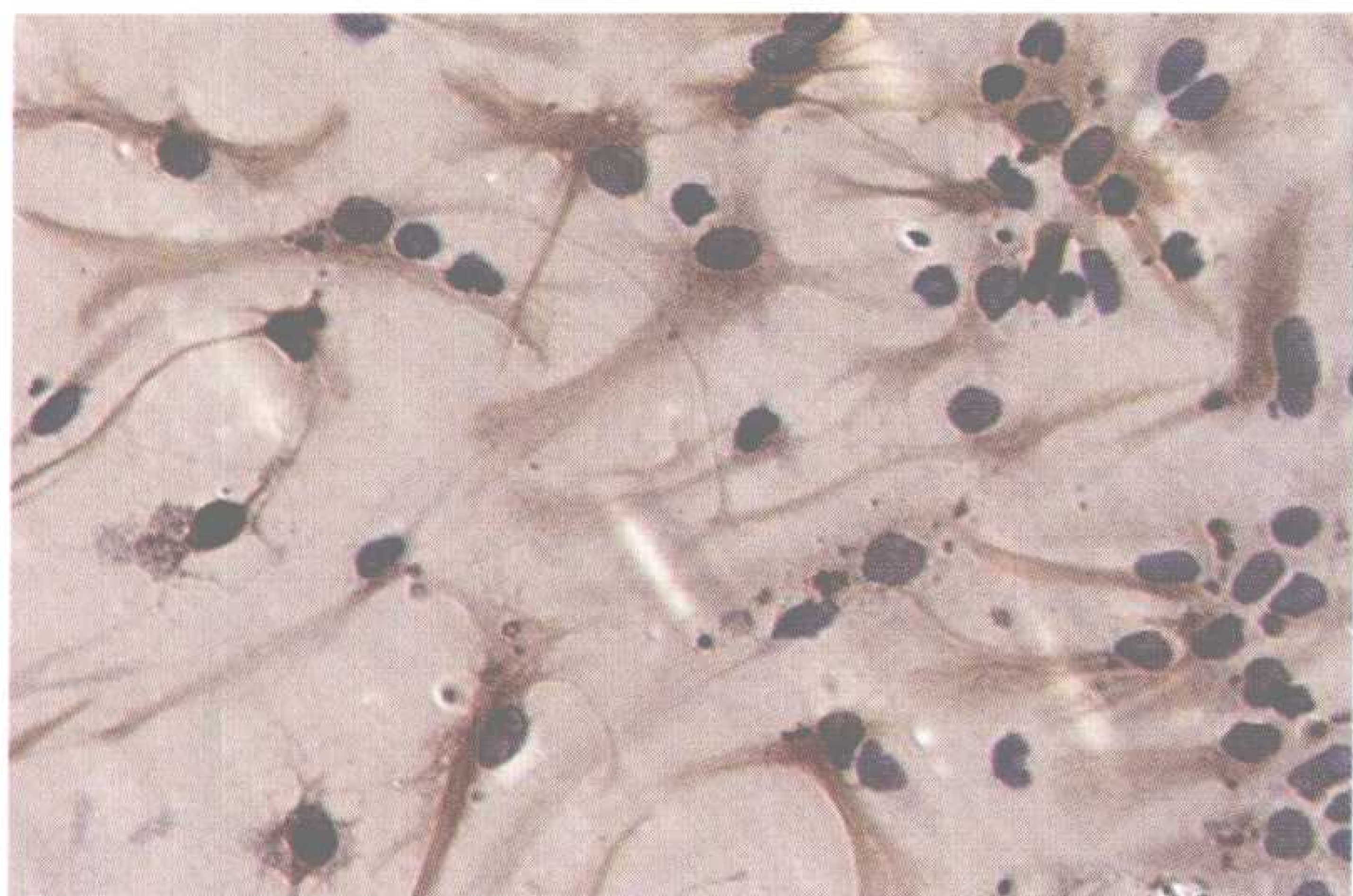


图3-20　体外培养的小鼠神经细胞爬片，显示星形胶质细胞（深棕色）

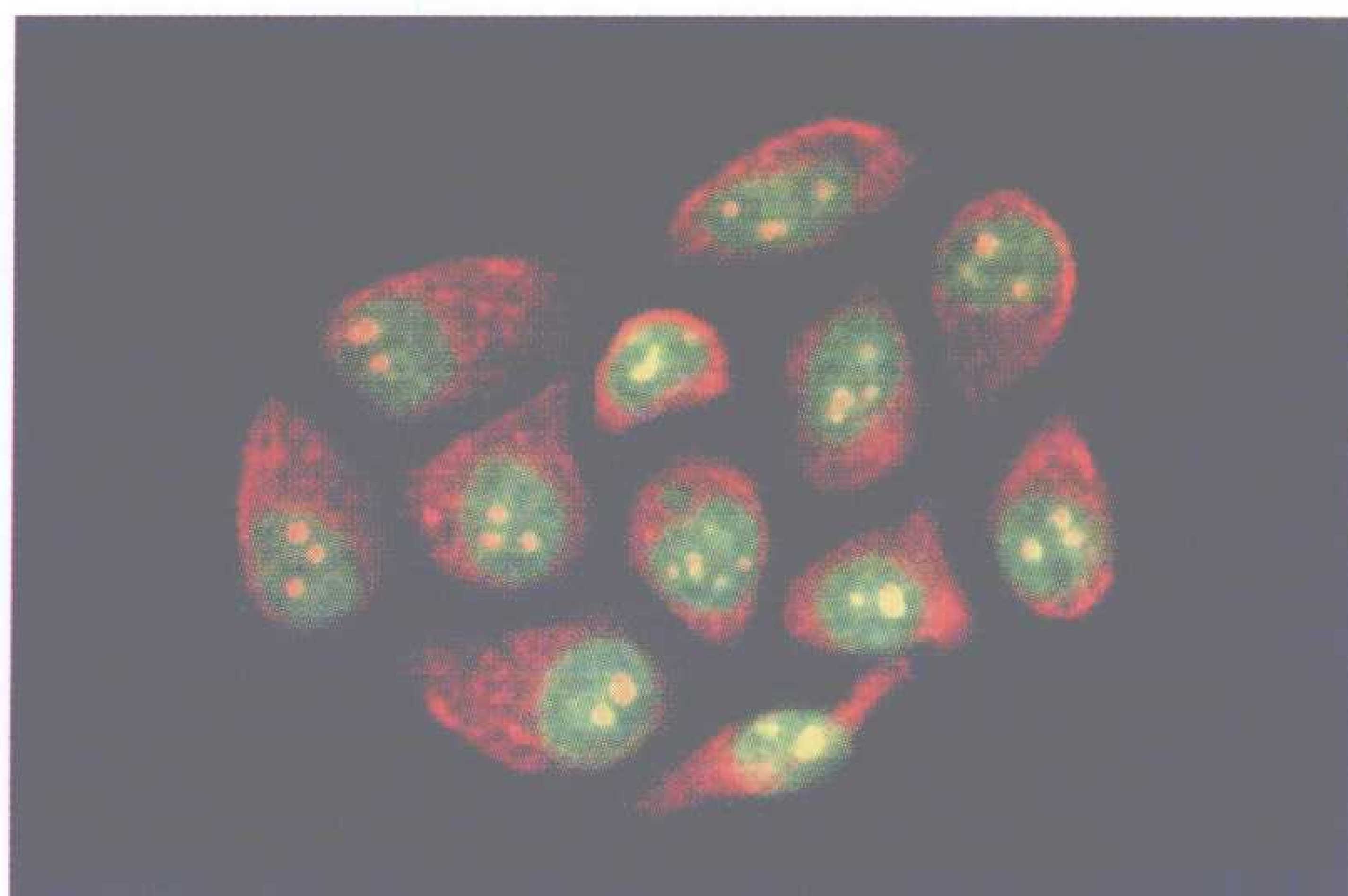


图3-24　体外培养的肝癌细胞吖啶橙荧光染色

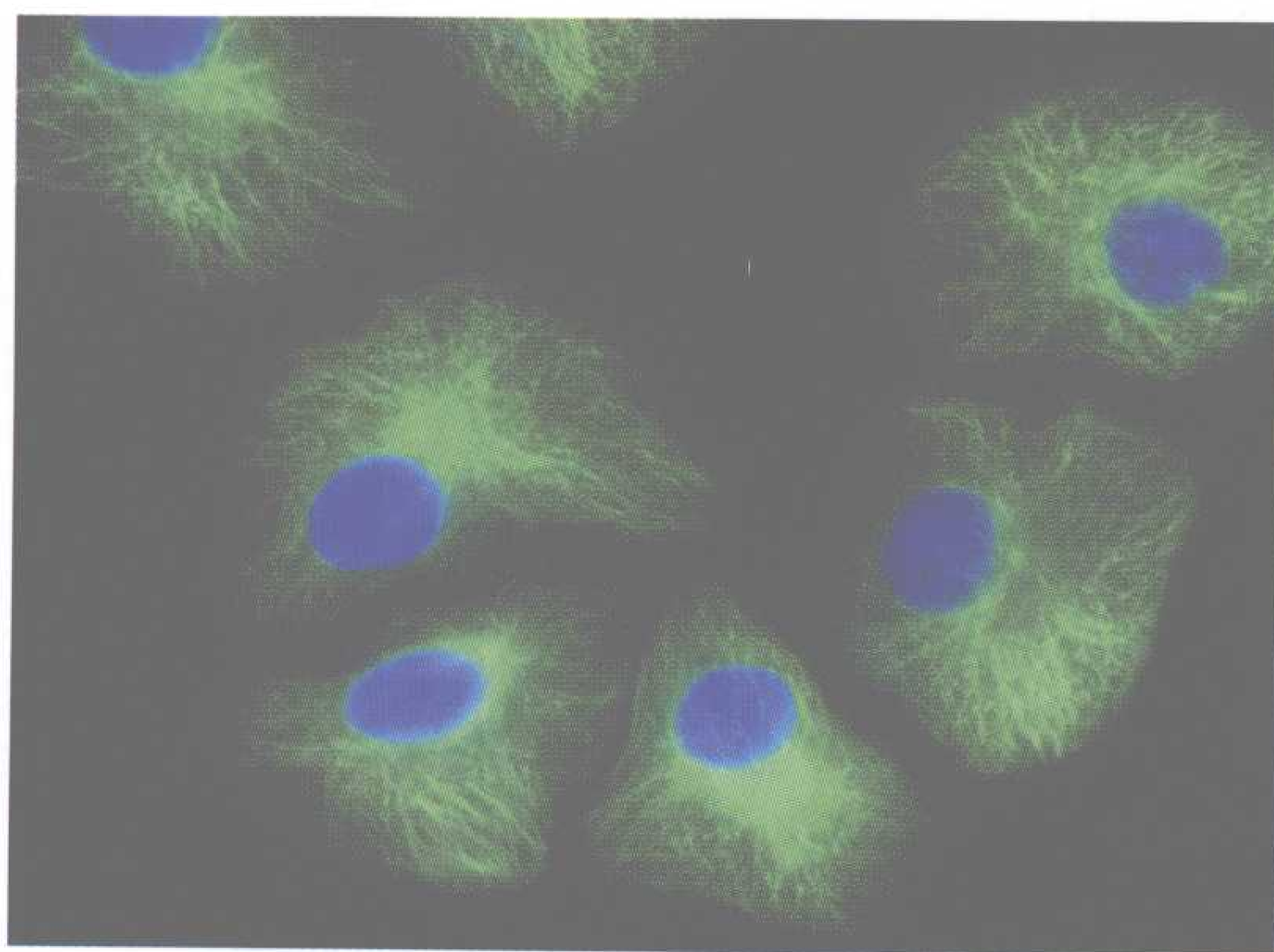


图3-25　人肝癌HepG2细胞质中分布的微管蛋白纤维（绿色荧光所示）

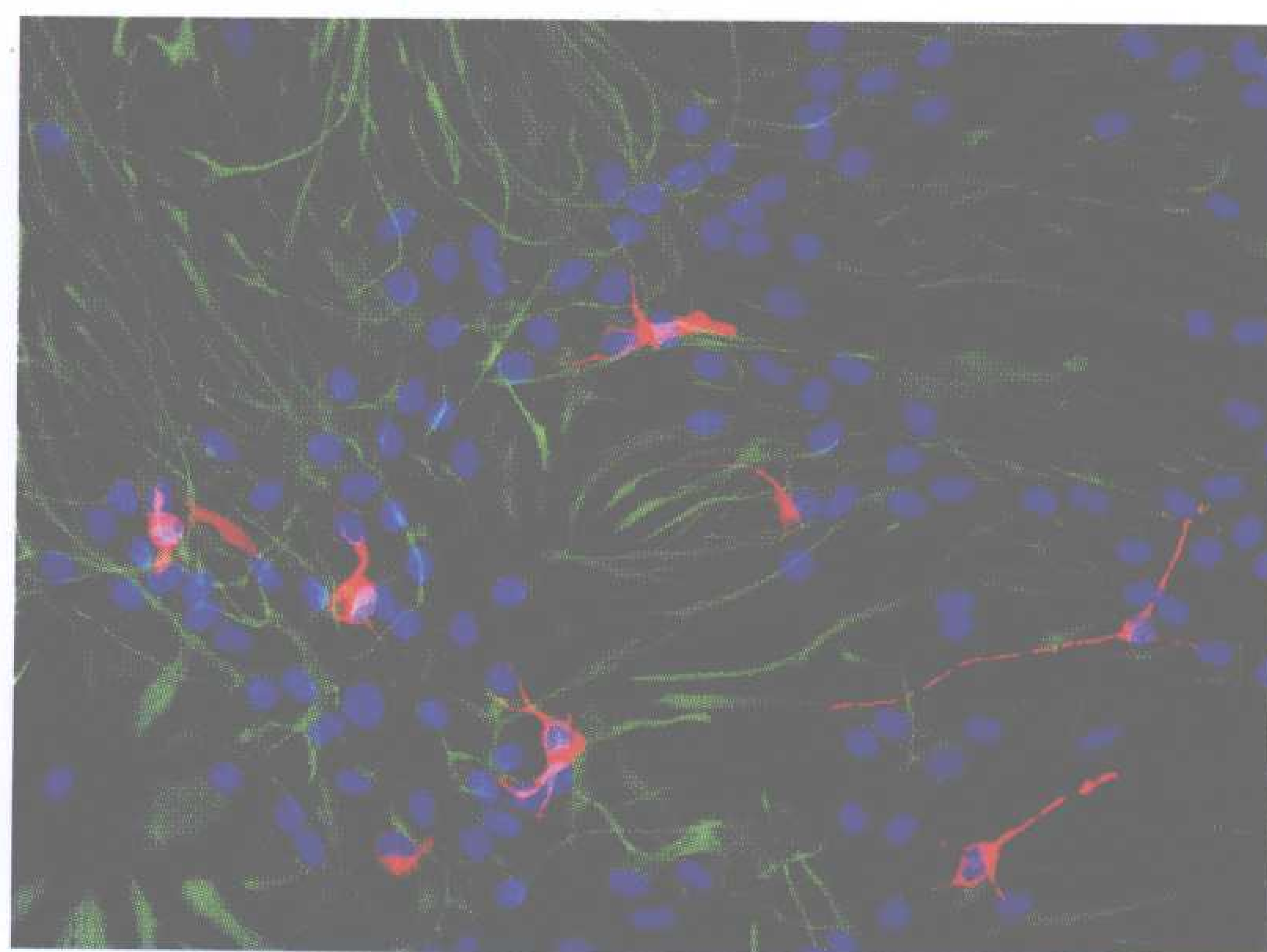


图3-26　双重免疫荧光标记的小鼠神经细胞（红色荧光显示Tuj1阳性神经元，绿色荧光显示GFAP阳性星形胶质细胞，DAPI复染细胞核发蓝色荧光）

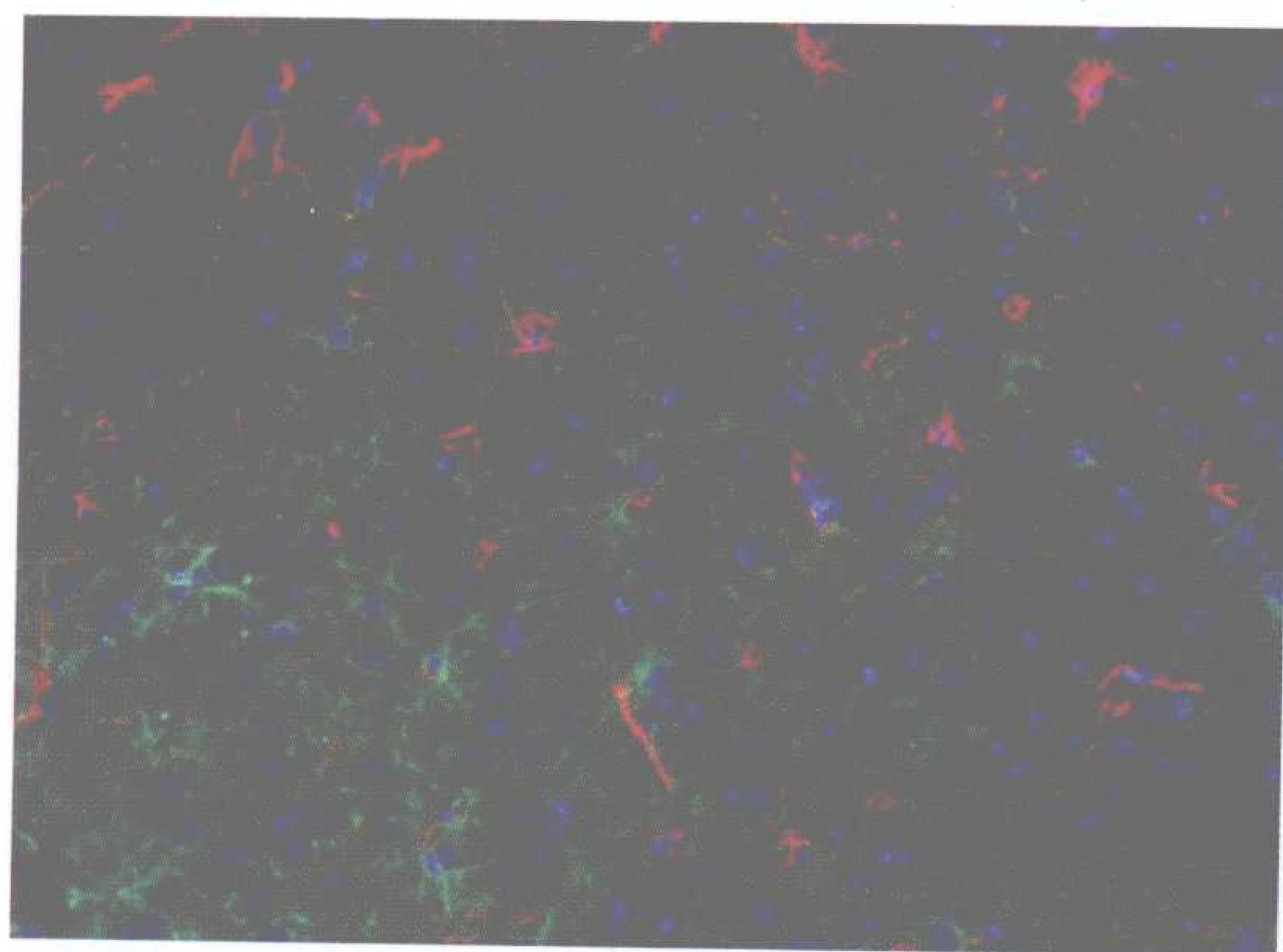


图3-27　小鼠脑石蜡切片显示星形胶质细胞（红色）和少突胶质前体细胞（绿色）

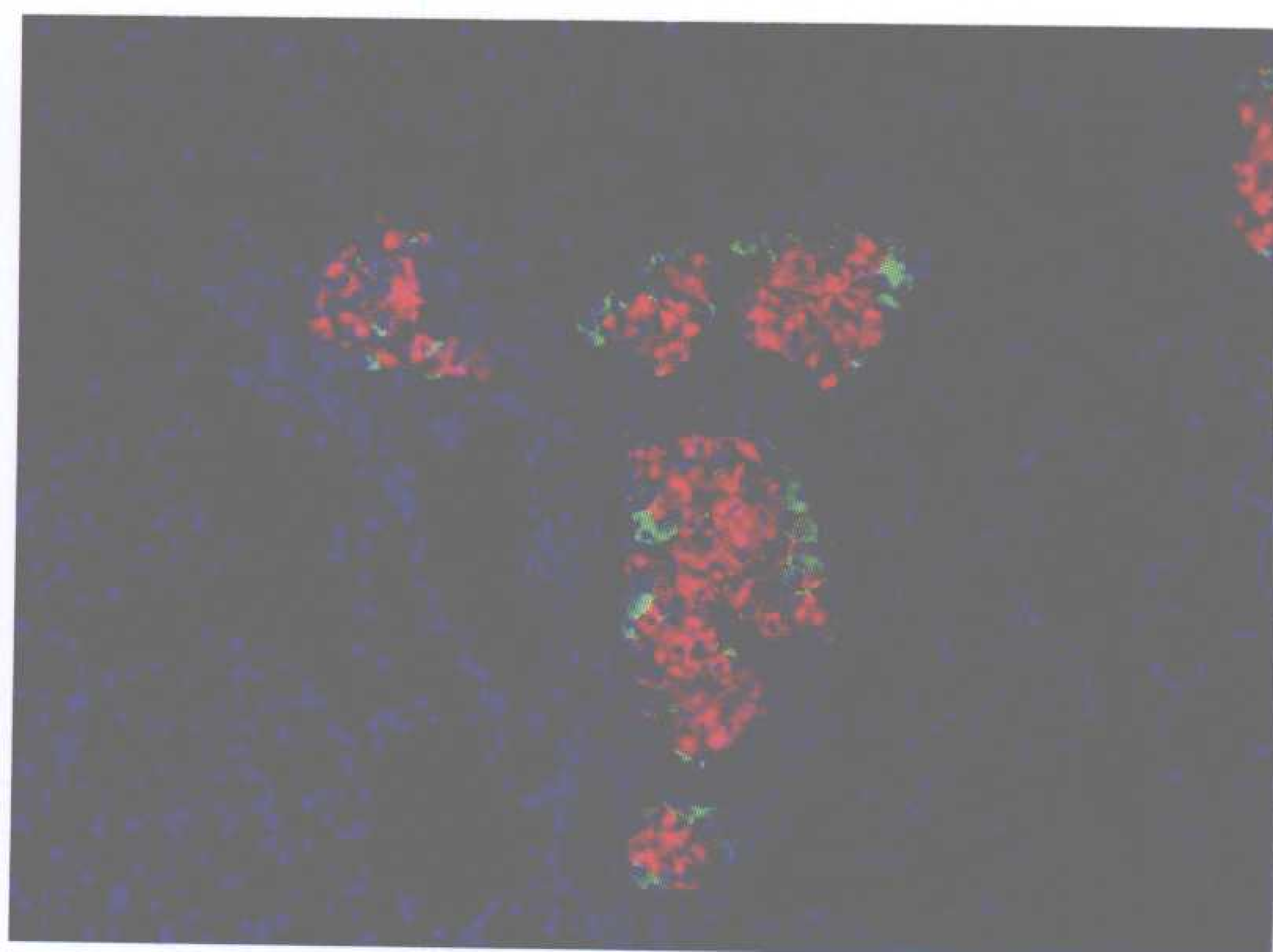


图3-28　小鼠胰腺冰冻切片，显示胰岛β-细胞（红色）和α-细胞（绿色），蓝色是DAPI显示的细胞核（照片由Dr Qian Wang提供）

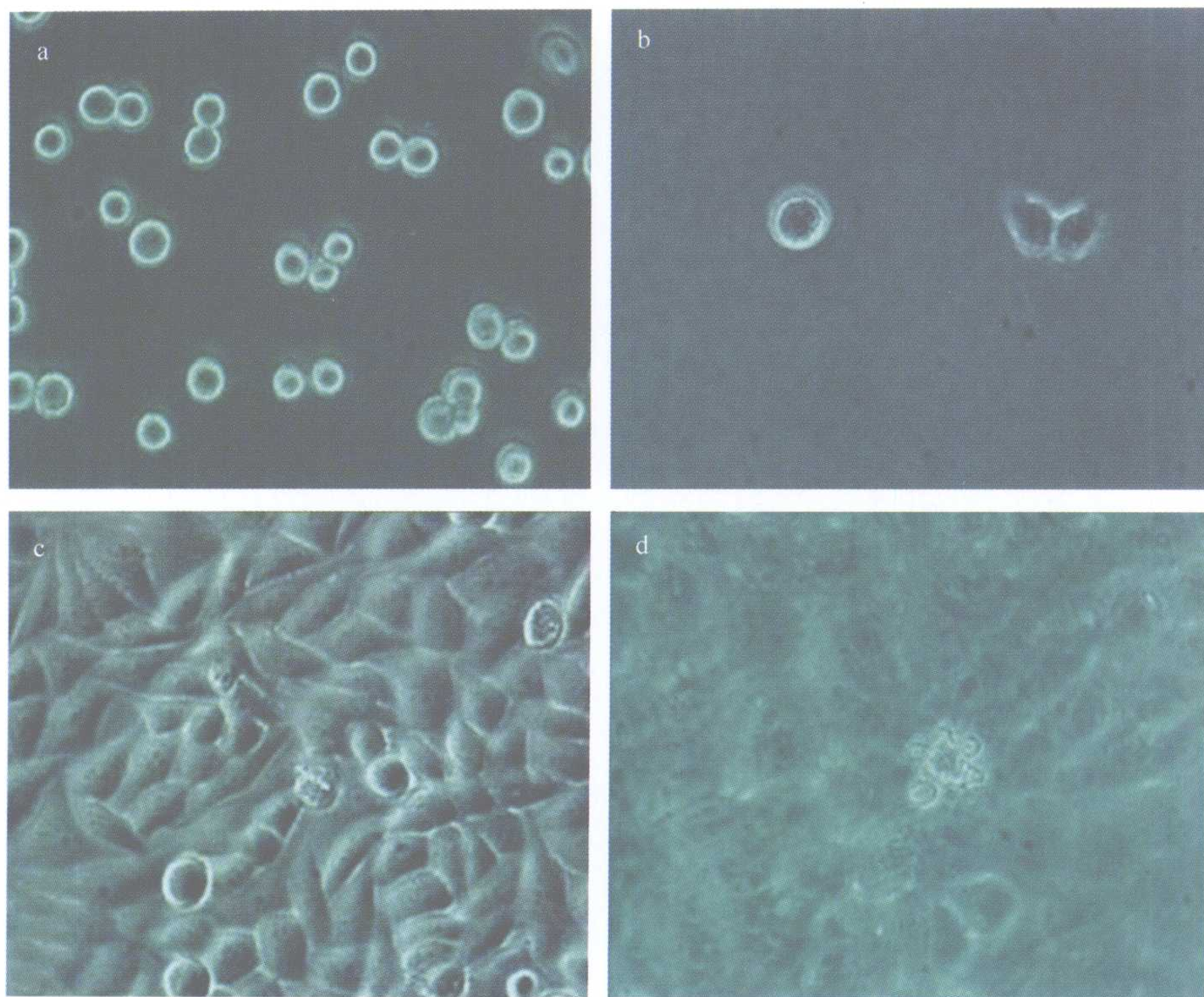


图4-9　处于不同生长阶段的HeLa细胞
a. 游离期；b. 吸附期；c. 繁殖期；d. 衰退期

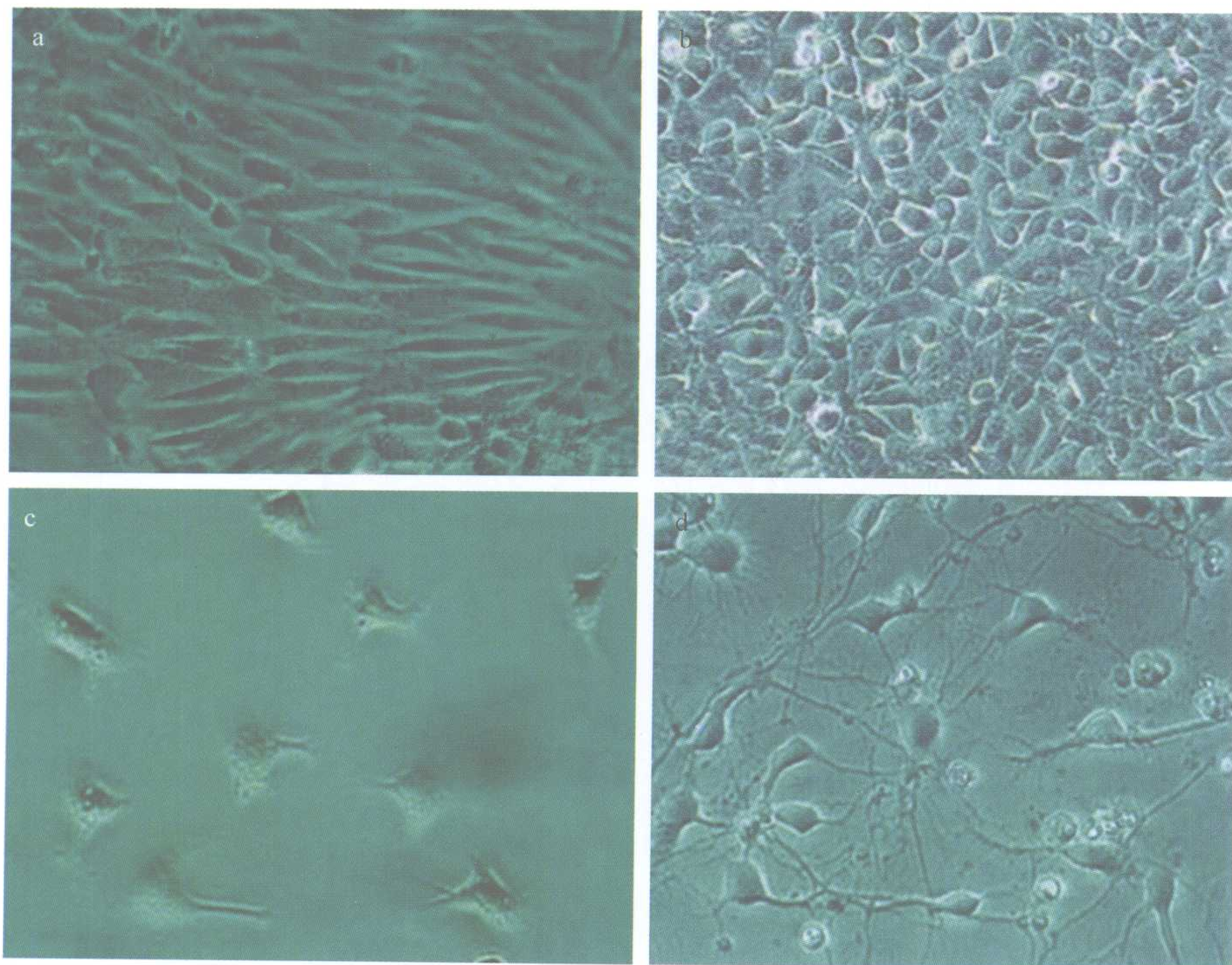


图4-10　培养细胞的类型
a. 成纤维型细胞；b. 上皮型细胞；c. 游走型细胞；d. 多形型细胞

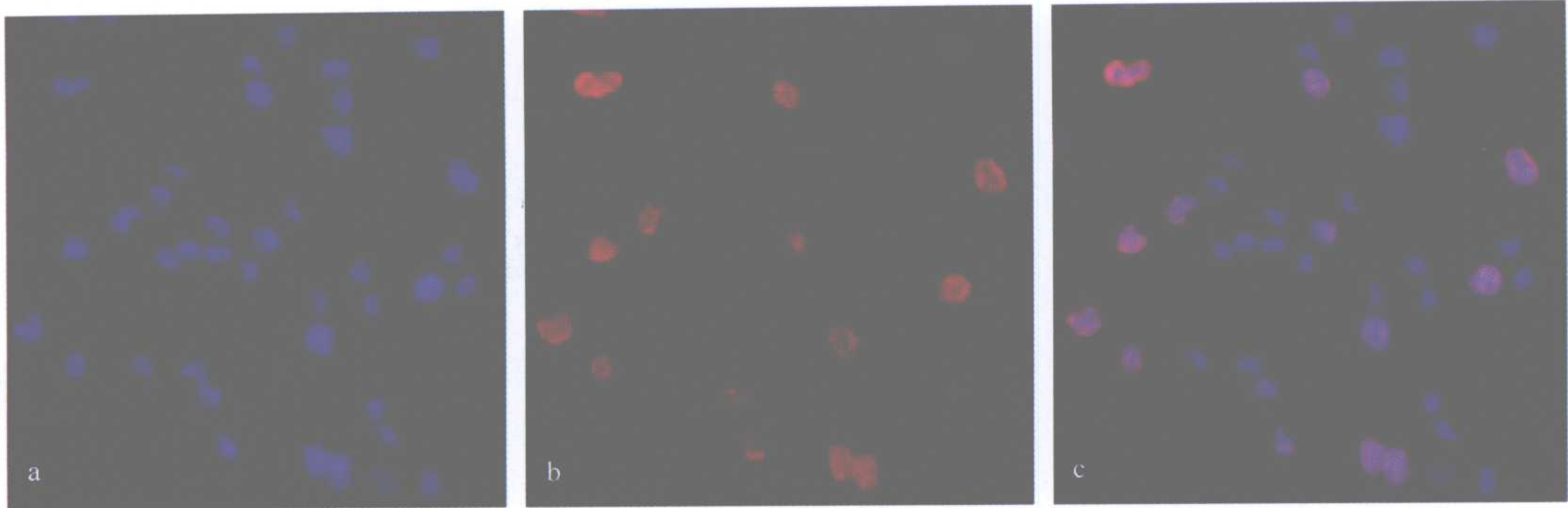


图4-15　培养细胞BrdU染色及DAPI复染的荧光照片
a. DAPI染色阳性细胞核；b. BrdU掺入阳性细胞核；c. DAPI+BrdU叠加后细胞核



图5-2　台盼蓝染色显示凋亡小体

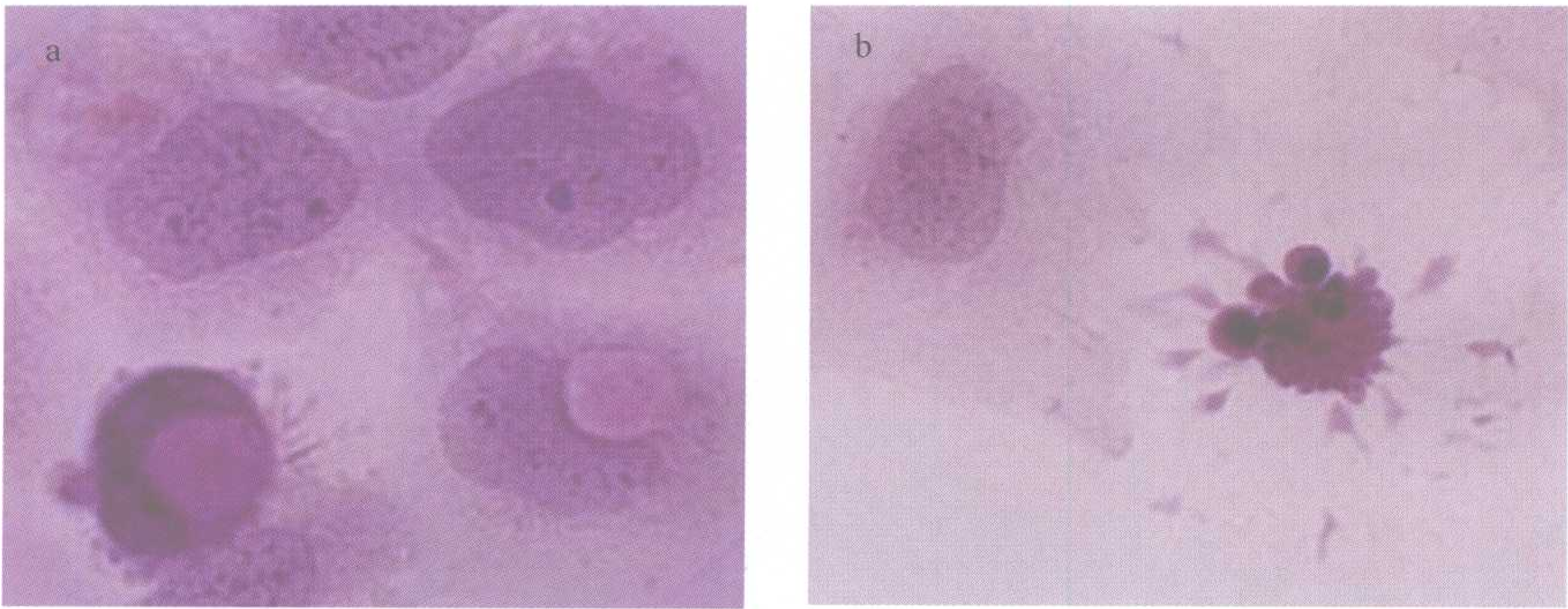


图5-3　HE染色显示凋亡细胞
a. 染色质新月形边集；b. 凋亡小体

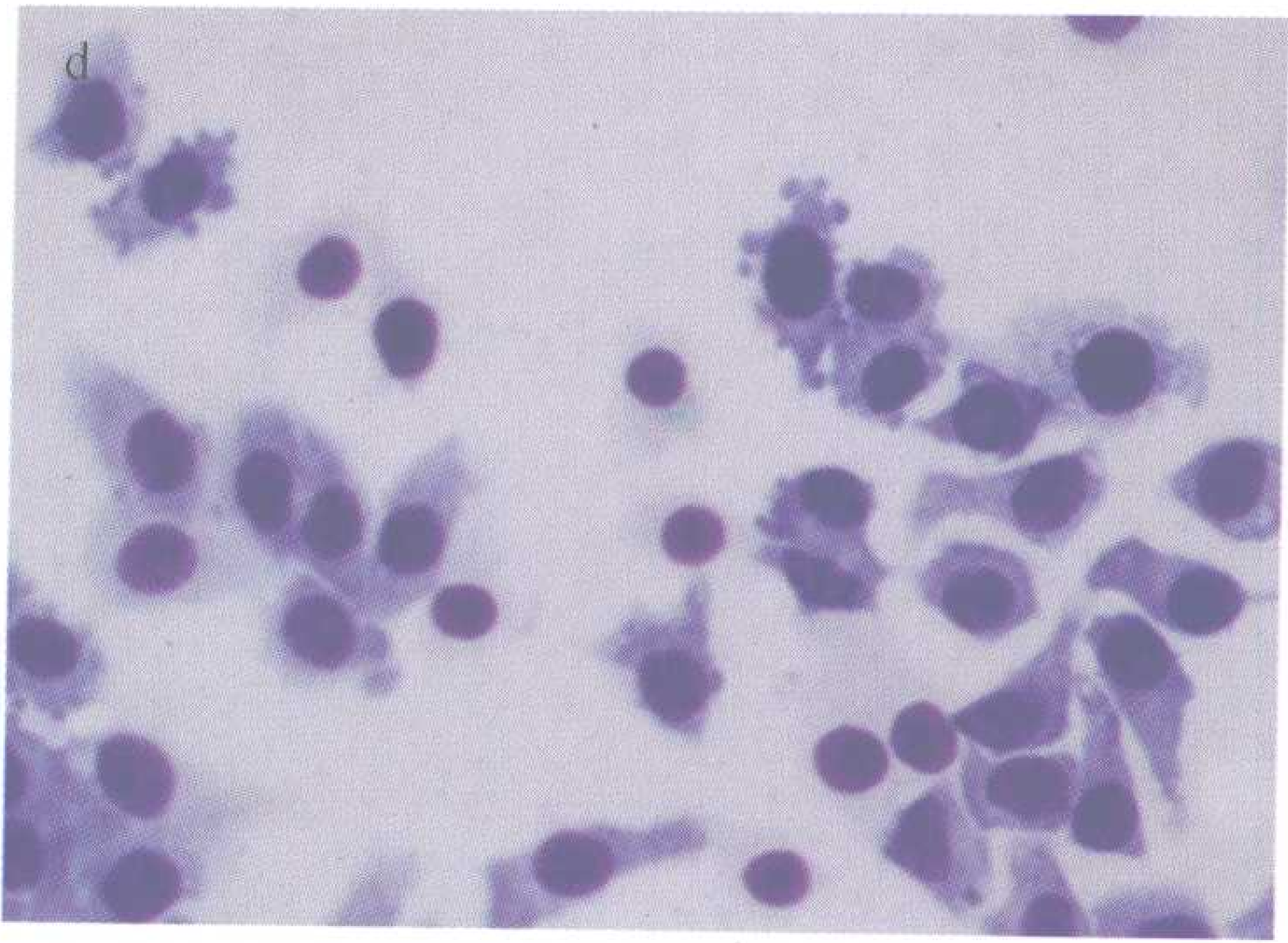


图5-4d　Giemsa染色显示人肝癌HepG2细胞凋亡小体

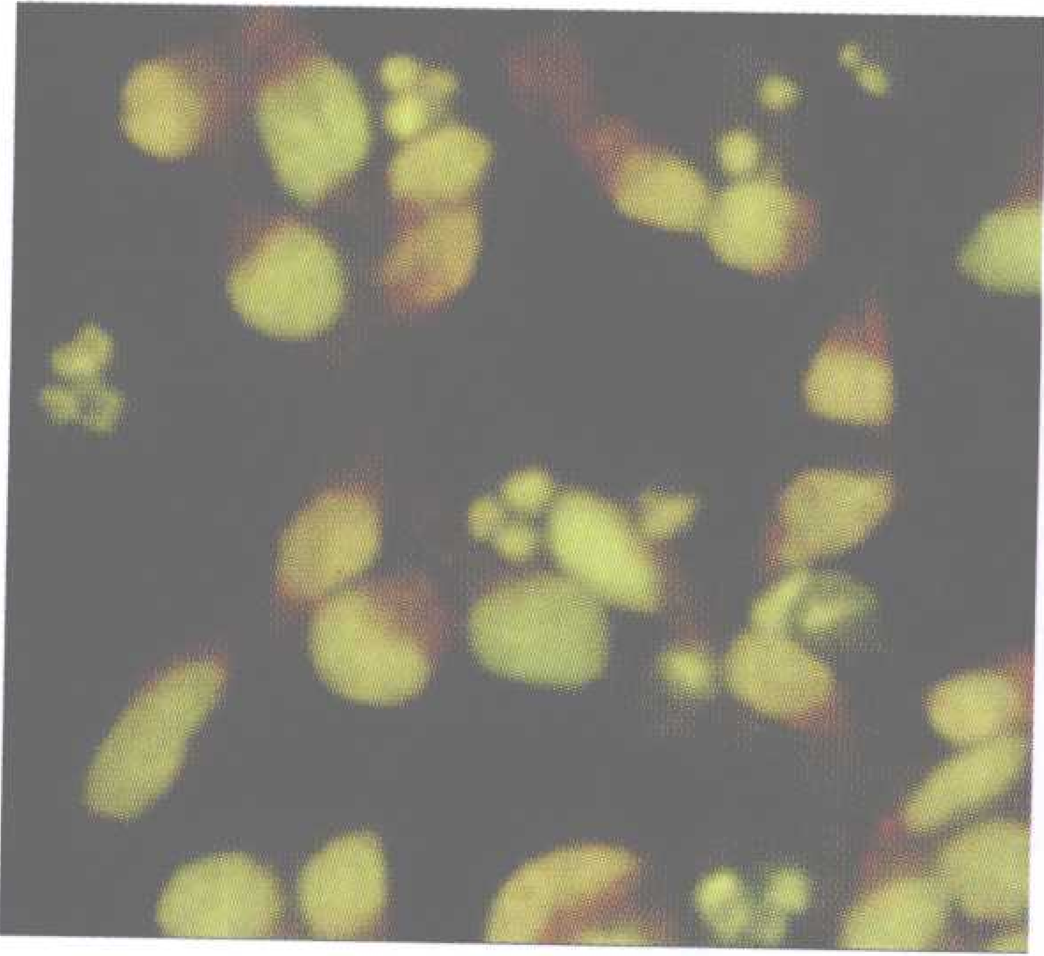


图5-5　吖啶橙荧光染色显示凋亡细胞

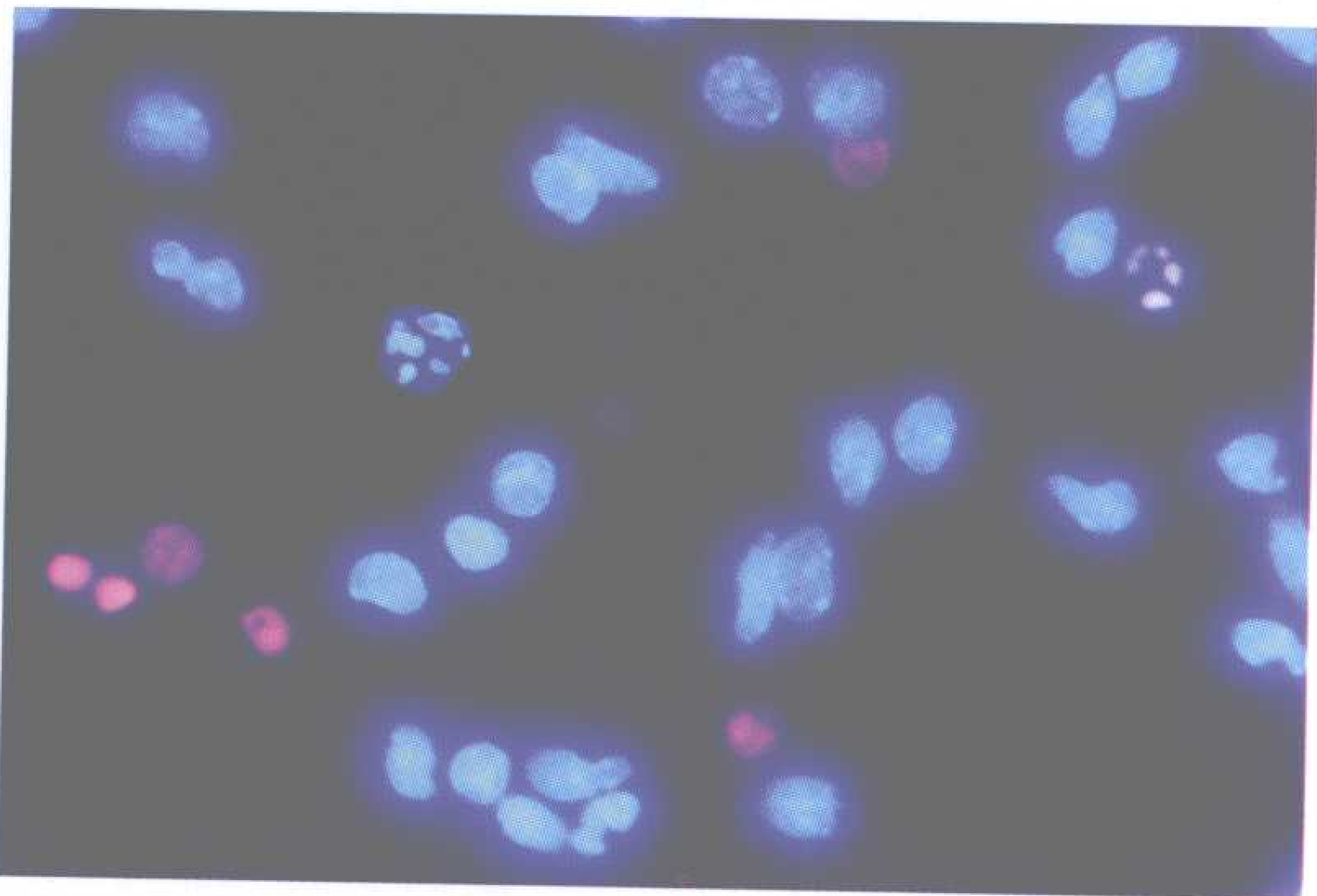


图5-6　PI /Ho. 33342双染显示凋亡与坏死细胞

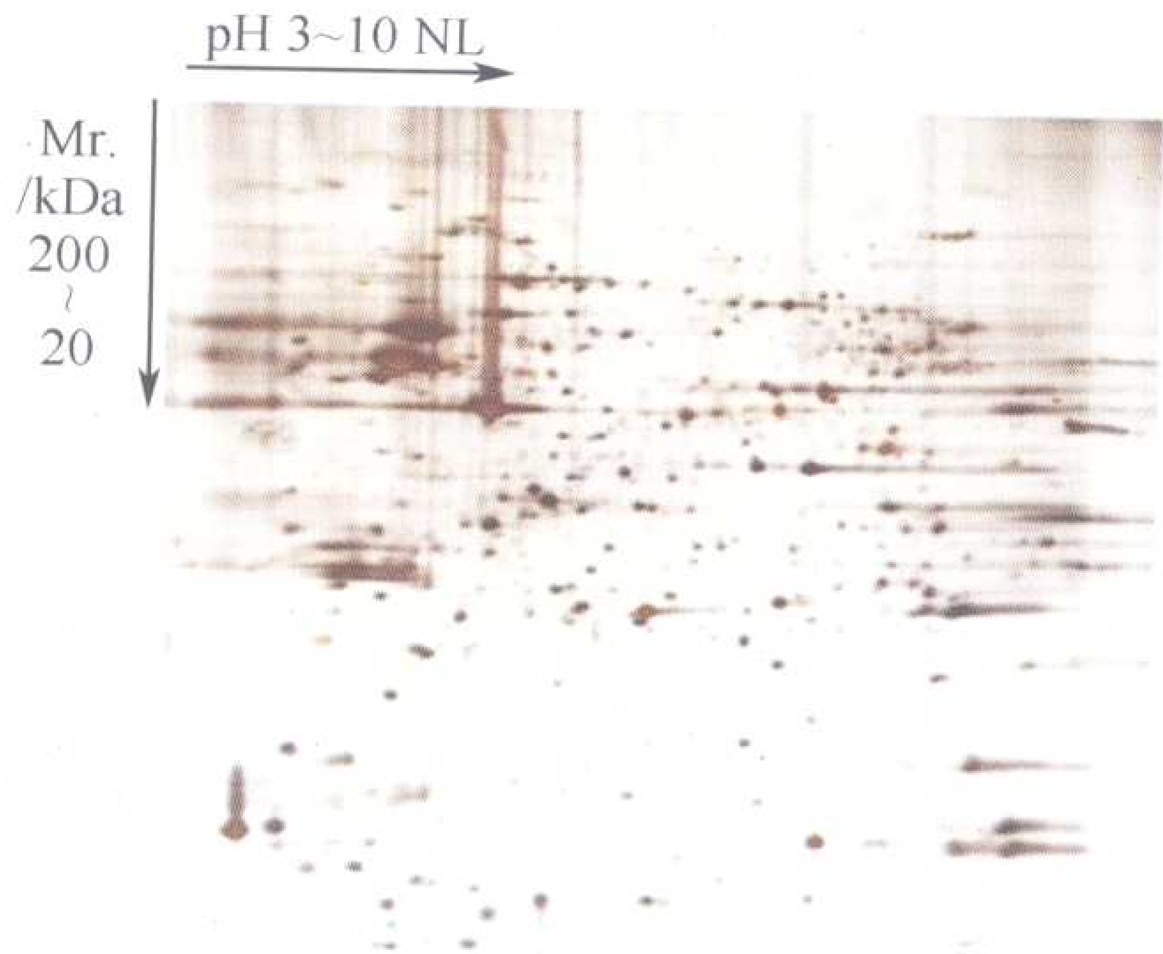


图8-6　鼠脑组织双向电泳银染图

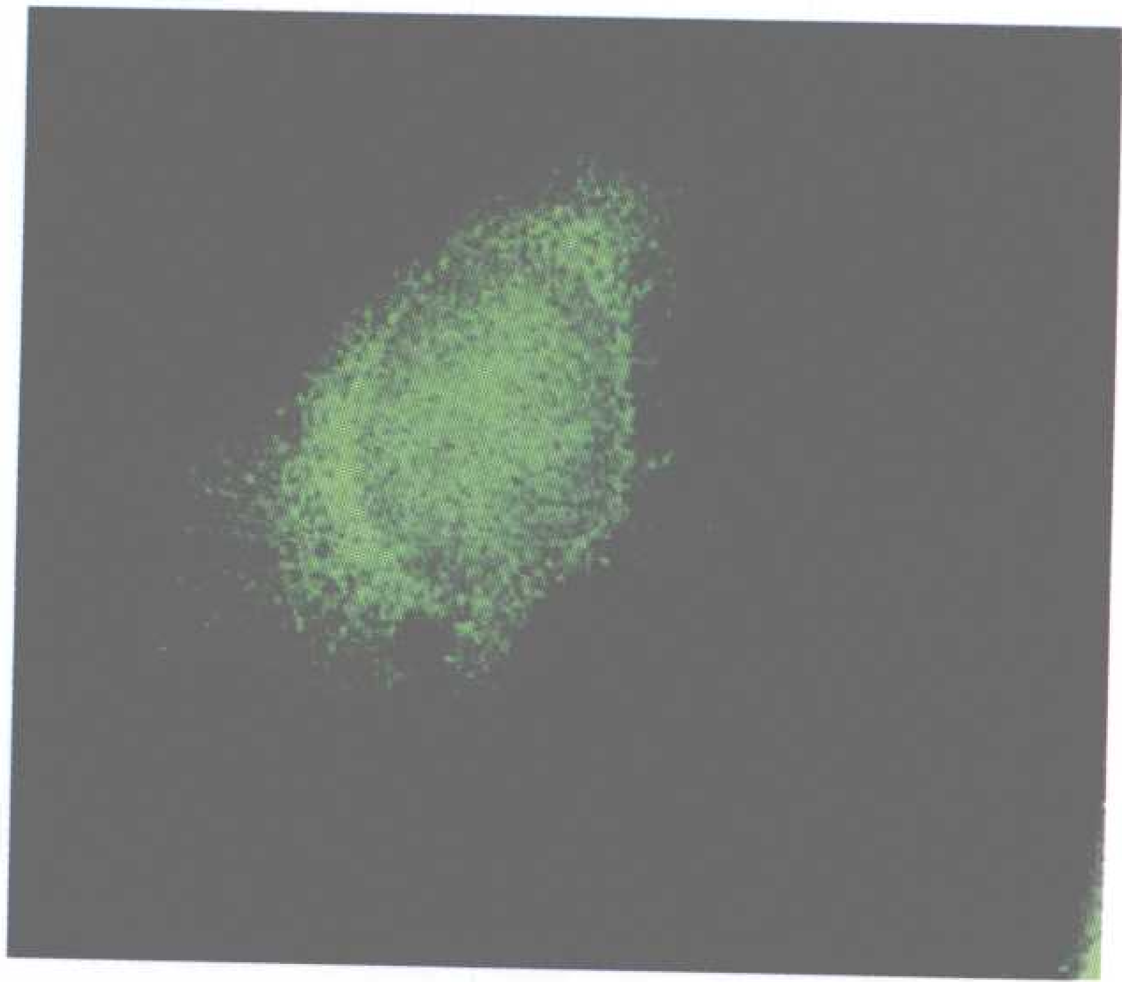
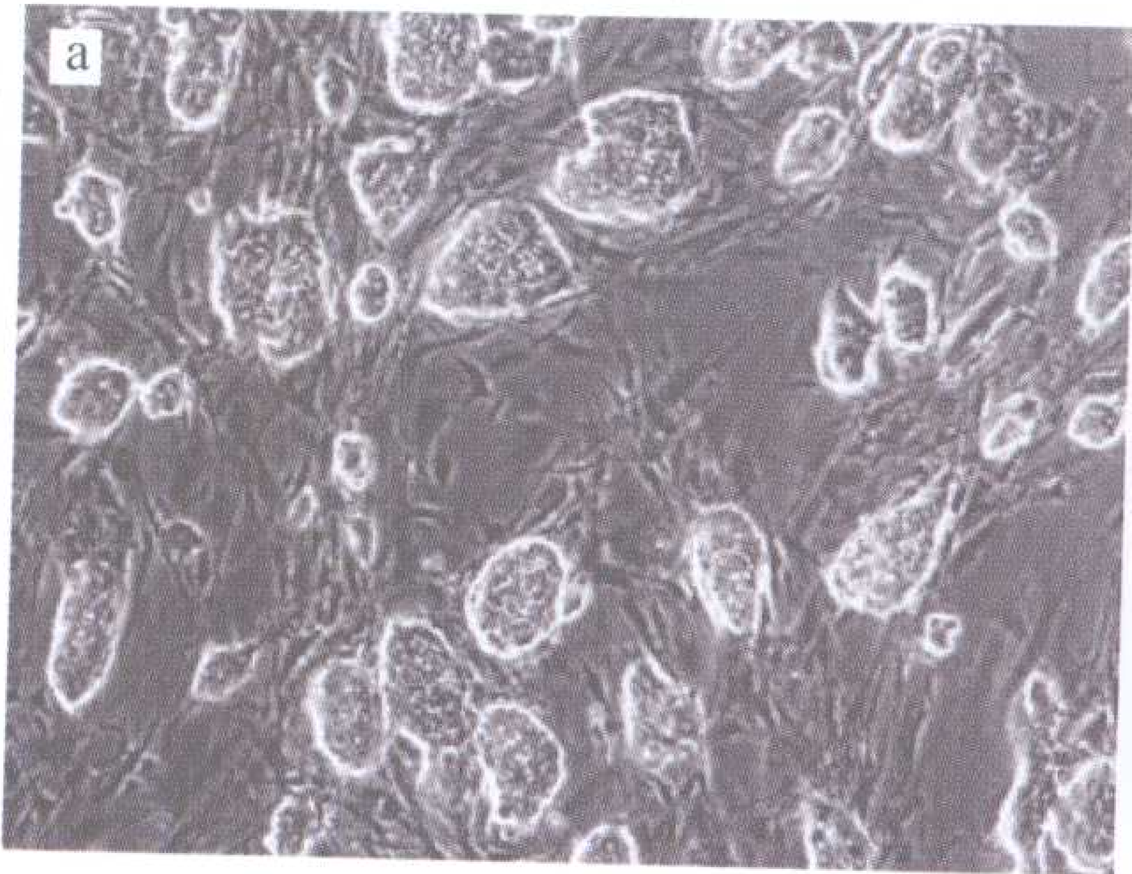


图9-4　GFP基因转染HeLa细胞后发出明亮的绿色荧光



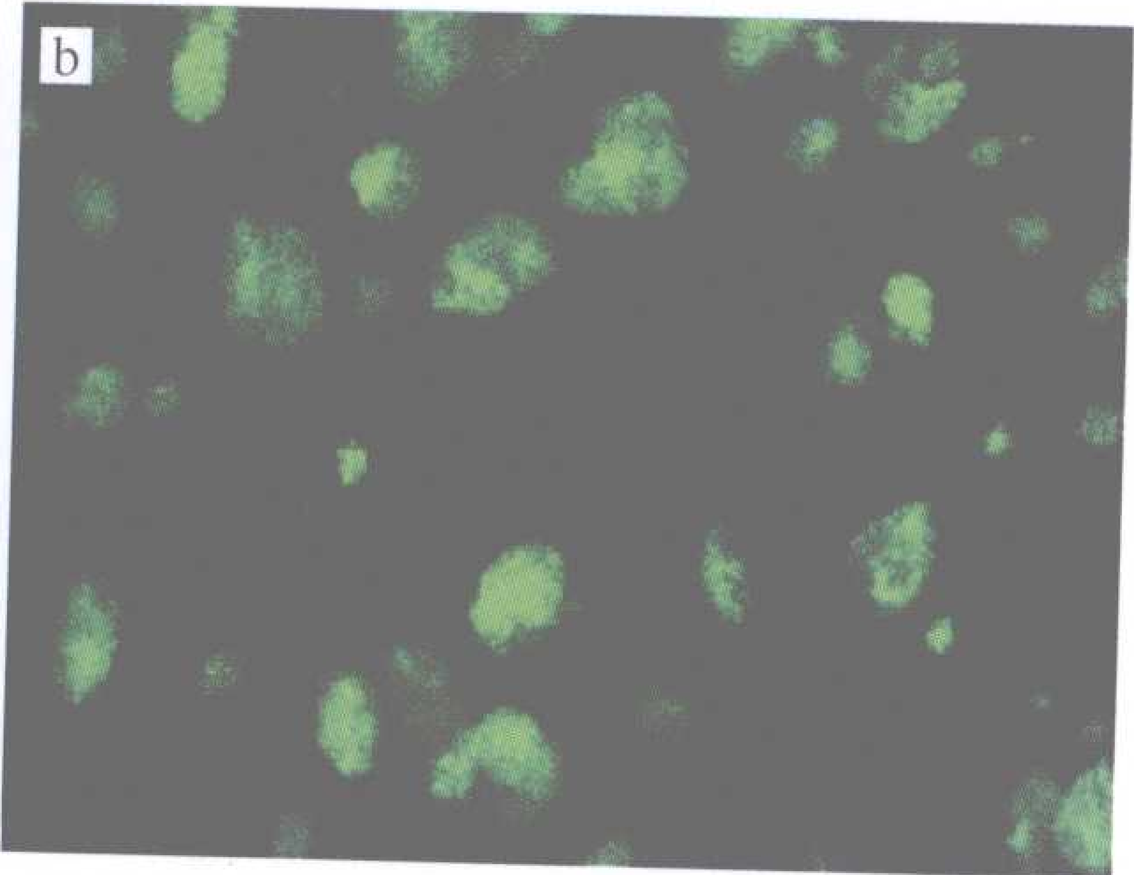


图11-1　小鼠胚胎干细胞细胞集落群（a）和相应的碱性磷酸酶染色阳性（b）

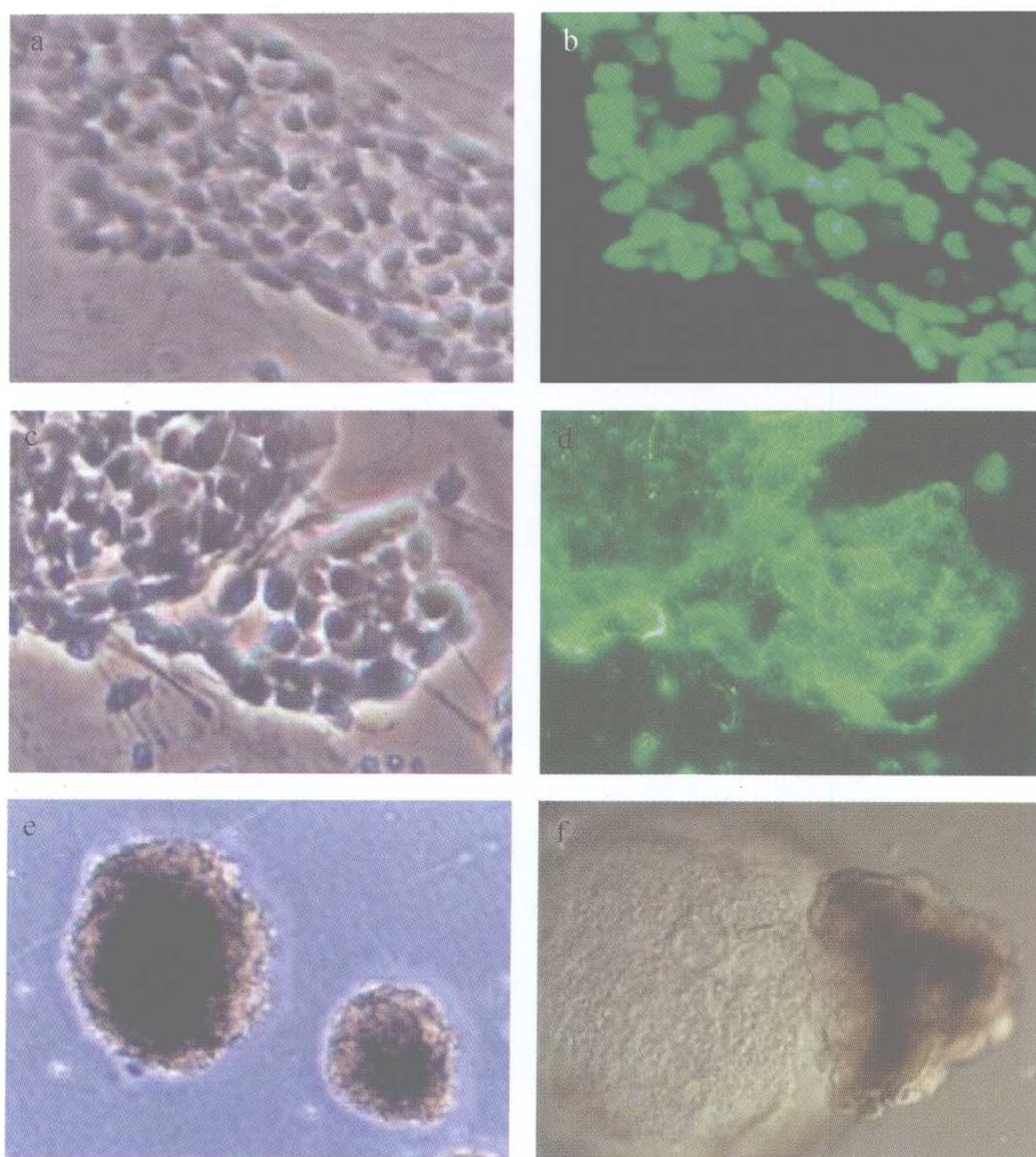


图11-2 小鼠ES 细胞的其他鉴定
a. 小鼠胚胎干细胞细胞集落；b. 显示 Oct-4 阳性；c. 小鼠胚胎干细胞细胞集落；d. 显示 SSEA-1阳性；e. 经消化后悬浮培养4天形成典型的类胚体；f. 悬浮培养10天形成典型的类胚体

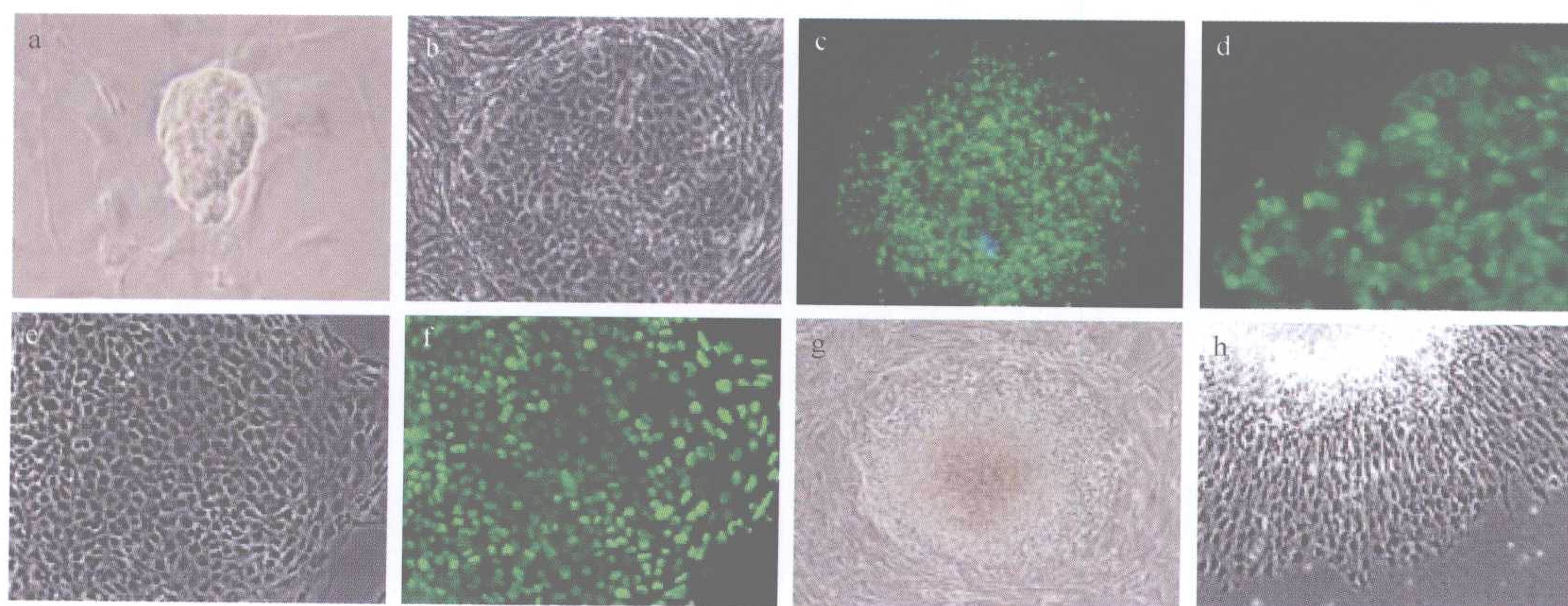


图11-4 人胚胎干细胞的分离、培养和分化
a. 先使用免疫外科法，再用细吸管清理去除滋养细胞。将整个内细胞团接种在小鼠胚胎成纤维细胞层上；b. 由内细胞团衍生出的健康干细胞集落,生长在小鼠胚胎成纤维细胞层上；c. 人胚胎干细胞集落显示碱性磷酸酶染色阳性；d. 显示 SSEA-4 阳性；e, f. 人胚胎干细胞集落显示Oct-3/4 阳性；g. 胚胎干细胞集落的中心出现“火山口”状结构，这是中心细胞开始分化的迹象；h. 从胚胎干细胞集落分化出来的细胞群

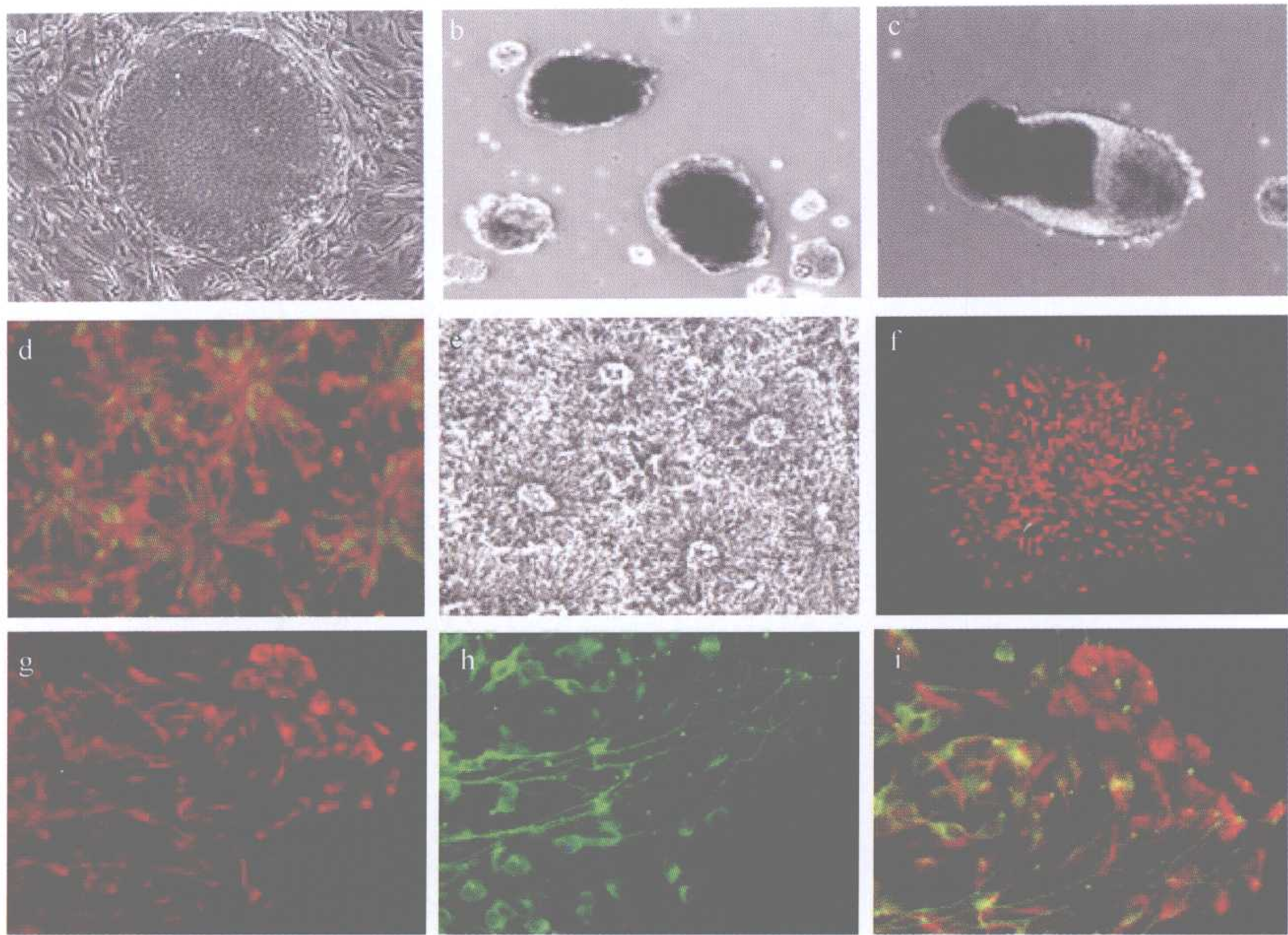


图11-6　人类胚胎干细胞分化成神经祖细胞和神经细胞

a. 由内细胞团衍生出的健康干细胞集落，生长在小鼠胚胎成纤维细胞层上；b. 经消化后悬浮培养5天，形成的类胚体；c. 然后在神经分化培养液里培养10天；d～e. 类胚体转移到聚-D-赖氨酸和层粘连蛋白包被的培养皿后，贴壁分化出来的花饰状神经外胚细胞群（neuroectodermal cell），用免疫荧光细胞化学方法染色 显示 sox1/nestin阳性的花饰状细胞群（d）；f. 花饰状细胞群近一步分化成nestin 阳性的神经祖细胞；g～i. 用免疫荧光细胞化学方法染色 显示 在同一区域的神经祖细胞群显示nestin（g）和神经细胞显示TuJ1 阳性（h），（i）为 g 和 h 放大后重叠起来的照片



图11-10　骨髓间充质干细胞分化形成骨、软骨和脂肪细胞（Pittenger，1999）

a. 脂肪细胞；b. 软骨细胞；c. 骨细胞。a图可见脂肪细胞内橙红色脂滴（red oil O 染色）；b图示软骨组织中Ⅱ型胶原蛋白（C4F6单克隆抗体染色）；c图示骨组织中碱性磷酸酶增加及钙沉积

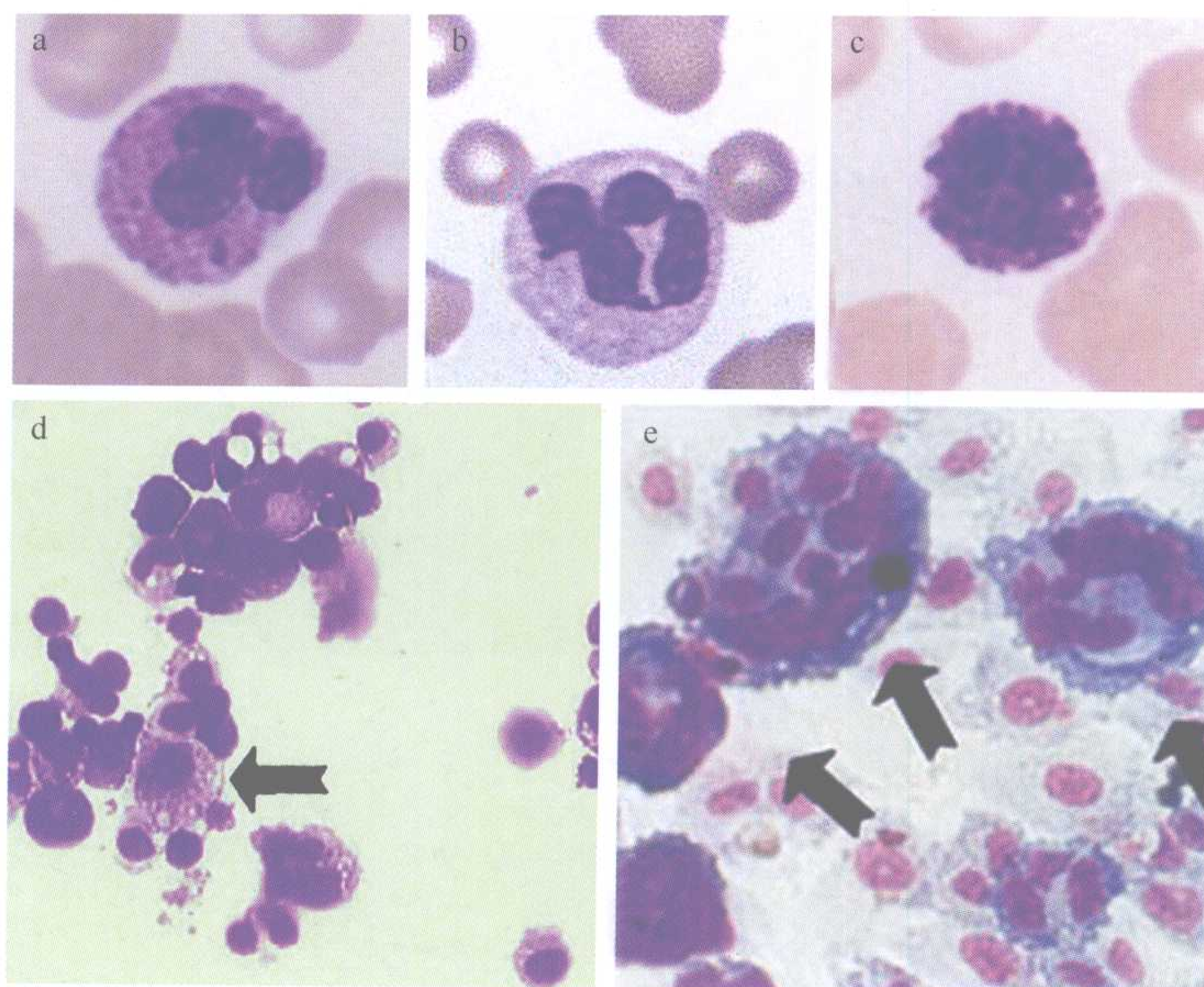


图11-15 细胞克隆原位片瑞氏染色观察

a. 嗜酸性粒细胞；b. 嗜中性粒细胞；c. 嗜碱性粒细胞；d. CFU-GM混合集落中粒细胞与巨噬细胞混合，箭头所指为巨噬细胞；e. CFU-MK集落，箭头所指为巨核细胞

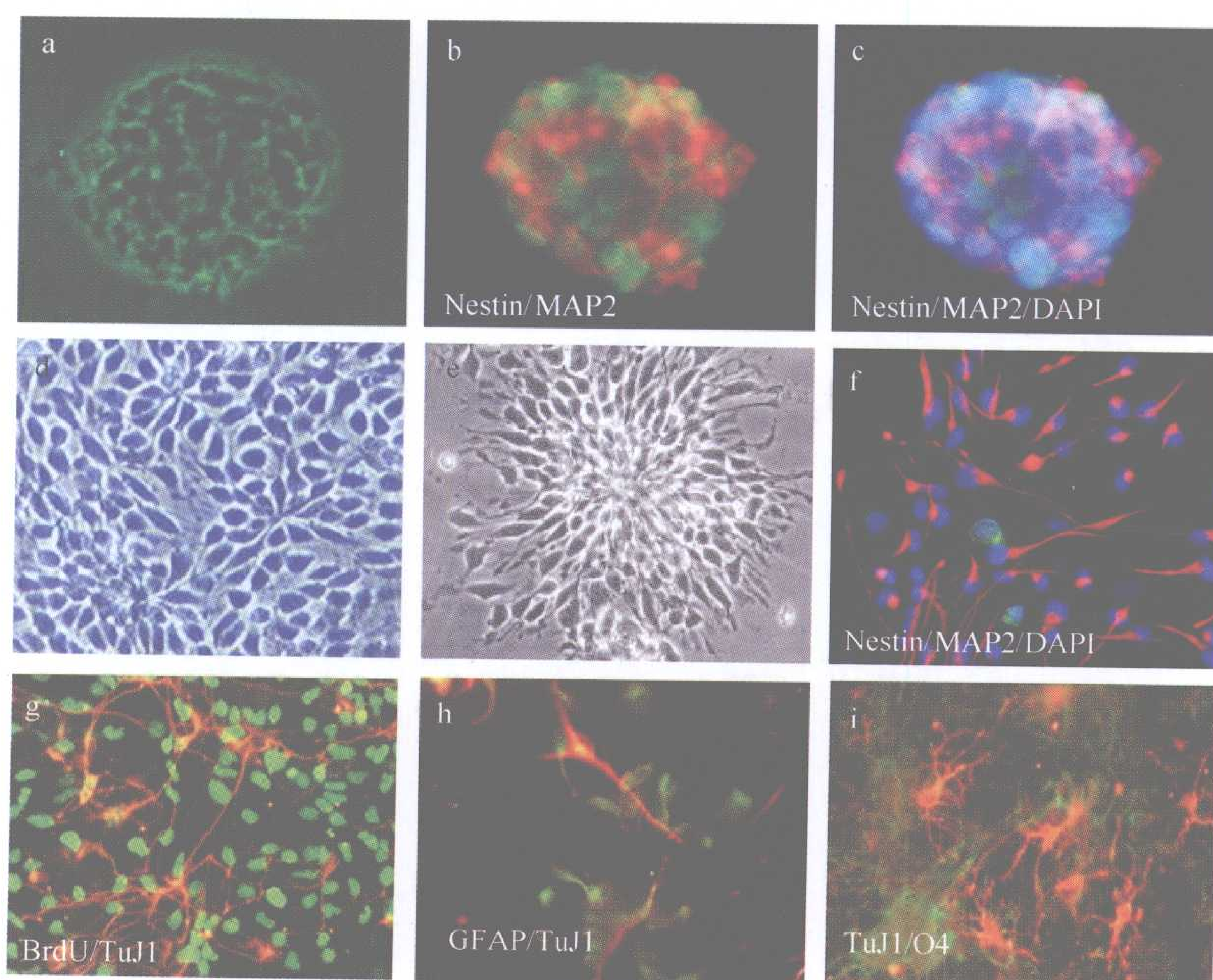


图11-17 大鼠胚胎脑神经干细胞和祖细胞的分离培养

a～c. 用悬浮法体外培养的神经干细胞克隆球，该神经干细胞克隆球显示Nestin阳性的神经干细胞和祖细胞（红色），以及MAP2阳性的神经元（绿色）（b），（c）为将DAPI复染的细胞核叠加进图（b）后的效果图；d～i. 显示用贴壁法体外培养的神经干细胞，E13端脑分离出的神经上皮细胞在Poly-D-Lysine/Fibronectin上培养5天（d），其中有的细胞扩展成集落样（Colony-like）结构（e），大多数细胞显示nestin阳性（f），一周后出现TuJ1阳性的神经元（g），接着出现GFAP阳性的星型胶质细胞（h）和O4阳性的少突胶质细胞（i）

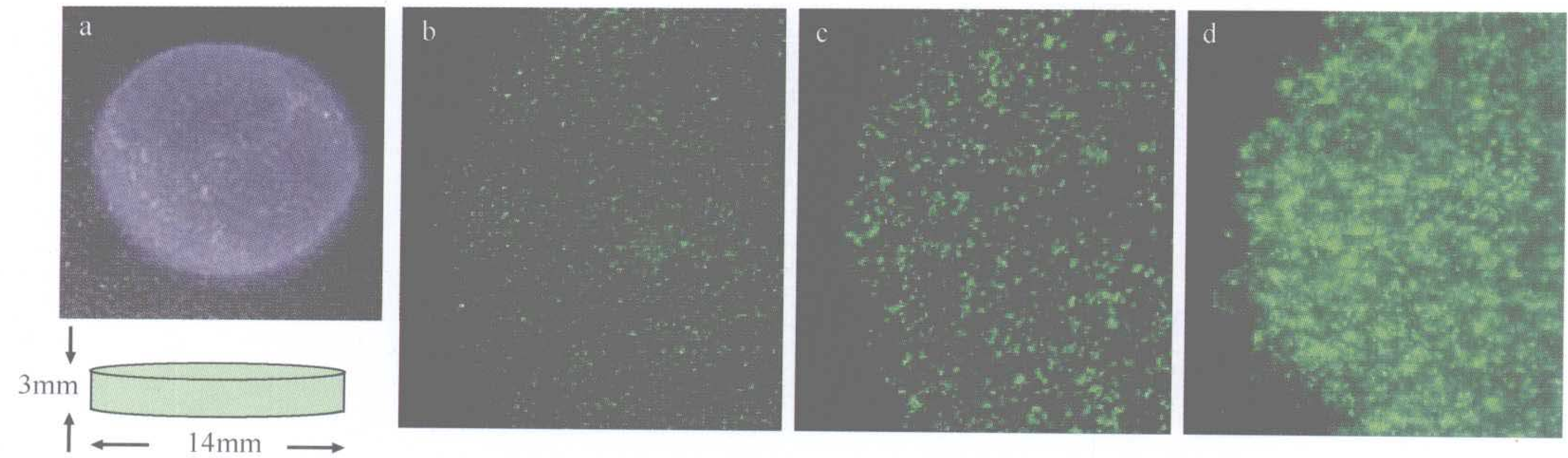


图11-19　生长在胶原蛋白支架里的神经干细胞和祖细胞迅速增殖

a. 是在24孔培养板形成的细胞-胶原结构体；b～d. 神经干细胞和祖细胞在胶原蛋白支架里迅速增殖1天（b）、4天（c）和14天（d）。使用Live/Dead荧光染色试剂鉴定细胞成活率，试剂中含有的calcein AM 仅仅将活细胞染绿色荧光

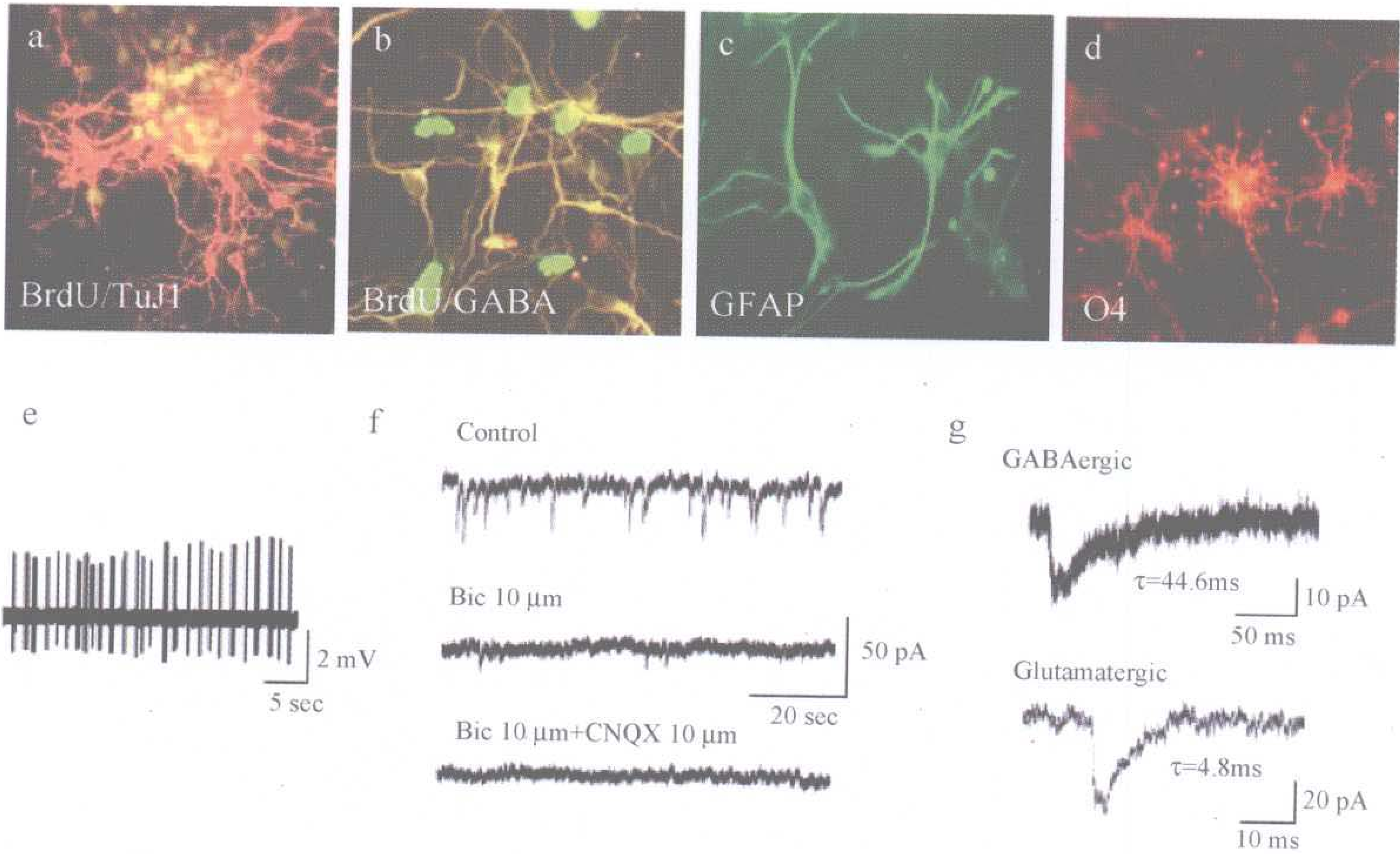


图11-20　生长在胶原蛋白支架里的神经干细胞和分化成的三种神经细胞，并形成有突触功能的神经网路

生长在胶原蛋白支架里的神经干细胞和祖细胞分化成神经元（a，b），星型胶质细胞（c）和少突胶质细胞（d），并且形成有突触功能的神经网路（e～g）。使用免疫细胞化学方法鉴定神经元（TuJ1阳性，GABA阳性），星型胶质细胞（GFAP阳性）和分化中的少突胶质细胞（O4阳性）。用膜片钳技术记录生长在胶原蛋白支架里的神经网路，显示神经动作电位（e），GABAergic和glutamatergic 突触后膜电流（f，g）

目　录

前言
第 1 章　研究显微镜与显微图像分析技术 …… 1
1.1　普通光学显微镜的构造和使用 …… 1
1.2　倒置相差显微镜的原理及使用 …… 6
1.3　荧光显微镜的原理及使用 …… 7
1.4　激光扫描共聚焦显微镜技术 …… 11
1.5　显微操作技术 …… 17
1.5.1　体细胞显微注射技术 …… 18
1.5.2　受精卵显微注射技术 …… 20
1.6　活细胞荧光显微成像技术 …… 26
1.7　细胞显微图像分析技术 …… 29
第 2 章　电镜技术 …… 35
2.1　透射电镜 …… 35
2.2　TEM 样品制备技术 …… 38
2.2.1　TEM 超薄切片技术 …… 38
2.2.2　TEM 负染色技术 …… 44
2.2.3　TEM 细胞化学技术 …… 46
2.2.4　石蜡组织与石蜡切片的 TEM 样品制备 …… 63
2.3　扫描电子显微镜 …… 64
2.4　SEM 样品制备 …… 66
2.4.1　常规 SEM 生物样品制备 …… 66
2.4.2　SEM 游离细胞制备 …… 68
2.4.3　SEM 免疫细胞化学技术 …… 71
第 3 章　细胞化学技术 …… 74
3.1　普通细胞化学 …… 74
3.1.1　细胞化学理论知识 …… 74
3.1.2　PAS（periodic acid Schiff reaction）法显示糖原 …… 77
3.1.3　苏丹Ⅲ染色法显示脂类 …… 80
3.1.4　酸性蛋白与碱性蛋白的显示 …… 81
3.1.5　细胞骨架微丝蛋白的显示 …… 82
3.1.6　Feulgen 法显示核酸 …… 84
3.1.7　甲基绿-派洛咛法显示核酸 …… 85
3.1.8　Giemsa 染色法显示染色质/体 …… 86
3.1.9　苏木精-伊红染色显示细胞核和细胞质 …… 87
3.2　酶细胞化学 …… 89
3.2.1　酶细胞化学的基本理论 …… 89

3.2.2　碱性磷酸酶显示 …… 91
3.2.3　金属沉淀法显示酸性磷酸酶 …… 93
3.2.4　联苯胺法显示过氧化物酶 …… 95
3.2.5　通过琥珀酸脱氢酶活性进行 MTT 法检测细胞相对存活率 …… 95
3.3　免疫细胞化学 …… 97
用 ABC 方法来鉴定体外培养的小鼠星形胶质细胞 …… 98
3.4　荧光细胞化学与免疫荧光细胞化学 …… 100
3.4.1　吖啶橙荧光染色法 …… 103
3.4.2　间接免疫荧光细胞化学法显示细胞中的微管蛋白 …… 105
3.4.3　用双重免疫荧光标记法鉴定体外培养的小鼠神经元和神经胶质细胞 …… 106
3.4.4　用双重免疫荧光法鉴定组织切片中的两种细胞的方法 …… 108
第 4 章　细胞培养技术 …… 111
4.1　细胞培养的基本原理与技术 …… 111
4.1.1　细胞在体外生长的条件 …… 111
4.1.2　培养细胞常用设备和用品 …… 113
4.1.3　培养用品的清洗 …… 116
4.1.4　培养用品的灭菌与消毒 …… 118
4.1.5　无菌操作的基本要领和要求 …… 119
4.1.6　细胞培养用液 …… 120
4.2　细胞培养的方法 …… 126
4.2.1　原代细胞培养 …… 126
4.2.2　细胞传代培养 …… 129
4.3　体外培养细胞的观察方法 …… 131
4.3.1　培养细胞的生长特征与形态分型 …… 131
4.3.2　培养细胞固定、染色观察的一般标本制备 …… 135
4.3.3　细胞计数方法 …… 137
4.3.4　细胞的显微测量 …… 138
4.4　培养细胞的冻存、复苏与运输 …… 140
4.5　培养细胞增殖动力学方法 …… 142
4.5.1　生长曲线的测定 …… 142
4.5.2　分裂指数测定 …… 143
4.5.3　克隆（集落）形成试验 …… 144
4.5.4　BrdU 掺入法测定细胞增殖指数 …… 145
4.6　肿瘤细胞黏附和侵袭能力的体外检测方法 …… 147
4.6.1　肿瘤细胞的黏附能力分析实验 …… 148
4.6.2　细胞侵袭重建基底膜实验 …… 149
4.6.3　肿瘤细胞迁移实验 …… 151
4.7　哺乳动物正常组织细胞的体外培养与应用 …… 153
4.7.1　胎鼠大脑皮层神经细胞的原代培养方法 …… 153
4.7.2　含药血清对体外培养细胞的药理实验 …… 155
4.7.3　四氯化碳致肝细胞损伤及 SOD 活性检测 …… 158

第 5 章　培养细胞凋亡检测技术 …… 162
5.1　光学显微镜形态学检测 …… 162
5.1.1　台盼蓝染色法显示凋亡细胞 …… 164
5.1.2　苏木精-伊红染色（HE 染色）显示凋亡细胞 …… 164
5.1.3　Giemsa 染色法显示凋亡细胞 …… 166
5.1.4　吖啶橙荧光染色显示凋亡细胞 …… 167
5.1.5　Ho.33342 与 PI 荧光双染显示凋亡与坏死细胞 …… 168
5.2　凋亡细胞的超微结构观察 …… 169
5.2.1　透射电镜观察凋亡细胞 …… 169
5.2.2　扫描电镜观察凋亡细胞 …… 170
5.3　凋亡细胞琥珀酸脱氢酶活性检测（MTT 法） …… 171
5.4　DNA 电泳检测凋亡梯状带 …… 172
5.5　细胞膜磷脂酰丝氨酸荧光显示 …… 173
5.6　凋亡细胞原位末端标记 …… 174
第 6 章　细胞工程 …… 178
6.1　细胞融合 …… 178
6.1.1　聚乙二醇介导的细胞融合 …… 178
6.1.2　细胞电融合 …… 181
6.1.3　早熟染色体凝集的诱导和观察 …… 184
6.2　细胞的分离 …… 187
6.2.1　淋巴细胞的分离纯化 …… 187
6.2.2　死活细胞的分离 …… 188
6.3　细胞器的分离 …… 189
第 7 章　原位杂交技术 …… 192
7.1　地高辛标记的原位杂交 …… 193
7.2　放射性同位素标记的原位杂交 …… 196
7.3　胚胎整体原位杂交 …… 198
第 8 章　细胞化学成分的分离与测定 …… 206
8.1　蛋白质 SDS-PAGE 凝胶电泳 …… 206
8.2　真核细胞基因组 DNA 的提取 …… 207
8.3　真核细胞 RNA 的提取 …… 209
8.4　免疫沉淀法分离并定量分析目的蛋白质 …… 211
8.5　蛋白质免疫印迹法 …… 213
8.6　蛋白质双向电泳分析细胞和组织中的蛋白质群 …… 215
第 9 章　真核细胞基因转染与表达技术 …… 224
9.1　DNA 转染技术 …… 224
9.1.1　磷酸钙转染技术 …… 224
9.1.2　脂质体转染技术 …… 226
9.2　基因在细胞中表达的检测技术 …… 227
9.2.1　DNA 印迹杂交法 …… 227

9.2.2　RNA 印迹杂交法 …… 230

9.2.3　蛋白印迹杂交法 …… 233

9.2.4　绿色荧光蛋白基因转染及检测 …… 235

第 10 章　哺乳动物基因敲除技术 …… 237

10.1　常用基因打靶载体的设计原则 …… 237

10.1.1　*P21*（WAF1）基因打靶载体的构建 …… 237

10.1.2　*C-Crk* 基因打靶载体的构建 …… 239

10.1.3　视黄醇脱氢酶 *RDH15* 基因打靶载体的构建 …… 241

10.2　胚胎干细胞基因敲除 …… 243

10.2.1　胚胎干细胞的增殖和维持 …… 243

10.2.2　胚胎干细胞标准电穿孔 …… 246

10.2.3　鉴定、筛选重组的胚胎干细胞 …… 247

10.3　嵌合体小鼠的制备 …… 248

10.3.1　嵌合体小鼠的产生 …… 249

10.3.2　GPI 同工酶的水平淀粉凝胶电泳检测嵌合体小鼠 …… 252

10.4　基因敲除小鼠的建立 …… 253

10.4.1　提取鼠尾 DNA 用 PCR 来检测敲除基因 …… 253

第 11 章　干细胞和组织工程技术 …… 256

11.1　胚胎干细胞培养技术与方法 …… 256

11.1.1　小鼠胚胎干细胞的分离、培养及诱导分化 …… 256

11.1.2　人胚胎干细胞的分离和培养 …… 263

11.1.3　人类胚胎干细胞定向分化成神经细胞 …… 268

11.2　成体干细胞培养技术与方法 …… 272

11.2.1　成人骨髓基质干细胞培养、纯化及鉴定 …… 272

11.2.2　人造血干/祖细胞的体外培养与检测技术 …… 275

11.2.3　大鼠胚胎脑神经干细胞和祖细胞的分离培养 …… 283

11.3　神经组织工程 …… 287

第 12 章　流式细胞术 …… 294

12.1　流式细胞仪的结构、工作原理及应用 …… 294

12.2　流式细胞仪检测细胞膜受体（直标法） …… 297

12.3　流式细胞仪同时检测细胞内和细胞外抗原 …… 298

12.4　流式细胞仪检测细胞凋亡（PI 单染色法） …… 299

12.5　流式细胞仪检测细胞凋亡和坏死（PI 和 Annexin Ⅴ-FITC 双染色法） …… 301

12.6　流式细胞仪检测凋亡细胞内游离钙离子浓度变化 …… 303

图版

第 1 章　研究显微镜与显微图像分析技术

显微镜是观察微观世界的重要工具，没有它也就无法打开微观世界的大门。随着现代科学技术的发展，显微镜的种类越来越多，性能更加完善，使用范围也越来越广泛，它不仅可以用来观察细胞形态和内部结构，而且，还可以通过与其他技术的结合，进行细胞化学成分的定位、定性、定量，以及物质代谢、细胞生理、免疫和遗传等功能方面的研究，是生命科学基础研究中用途最广的一类仪器。学习和掌握现代研究显微镜的结构原理和操作方法，是每个从事生命科学基础研究者必须掌握的基本技能。本章重点介绍当今科学研究中几种常用研究显微镜的结构原理与应用及显微注射和图像分析技术。

1.1　普通光学显微镜的构造和使用

【实验原理】

成像原理（图 1-1）：标本（F_1）置于聚光器与物镜之间，目镜、物镜、聚光器各自相当于一个凸透镜。平行的光线自反光镜折射入聚光器，光线经聚光器集聚增强，照射在标本上。标本的像经物镜放大成像于 F_2 处，但像是倒像。目镜将此倒像进一步放大成像于人眼的视网膜上（F_3）——正像。

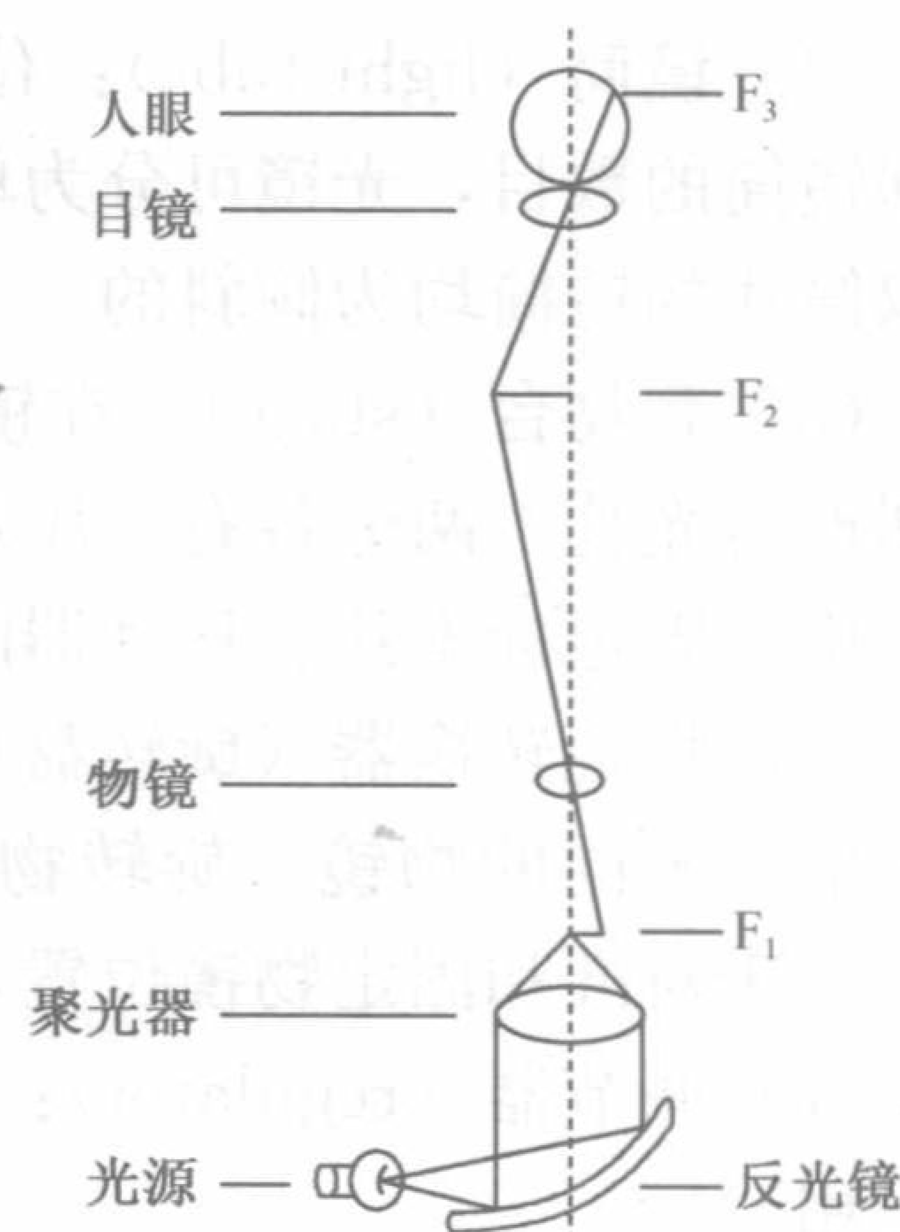


图 1-1　显微镜成像原理图

【实验用品】

（1）器材：普通光学显微镜（microscope）、擦镜纸（lens paper）。

（2）试剂：香柏油（cedar wood oil）、二甲苯（xylenoe）。

（3）标本片：A 字装片、羊毛交叉装片、人血涂片。

【内容与方法】

1. 普通光学显微镜的构造（图 1-2）

光学显微镜由三部分组成：机械部分、光学部分和照明部分。

1）机械部分

（1）镜座（base）：显微镜的基座。起稳定和支持整个镜身的作用。有些显微镜在镜座内装有照明光源等构造。

（2）镜柱（pillar）：连接镜座和镜臂的短柱。

（3）镜臂（arm）：镜柱上方弯曲部分，支持镜筒和镜台，拿镜时手握此臂。镜筒直立式光镜在镜臂和镜柱之间有一可活动的关节叫倾斜关节，可使镜臂作适当倾斜，便

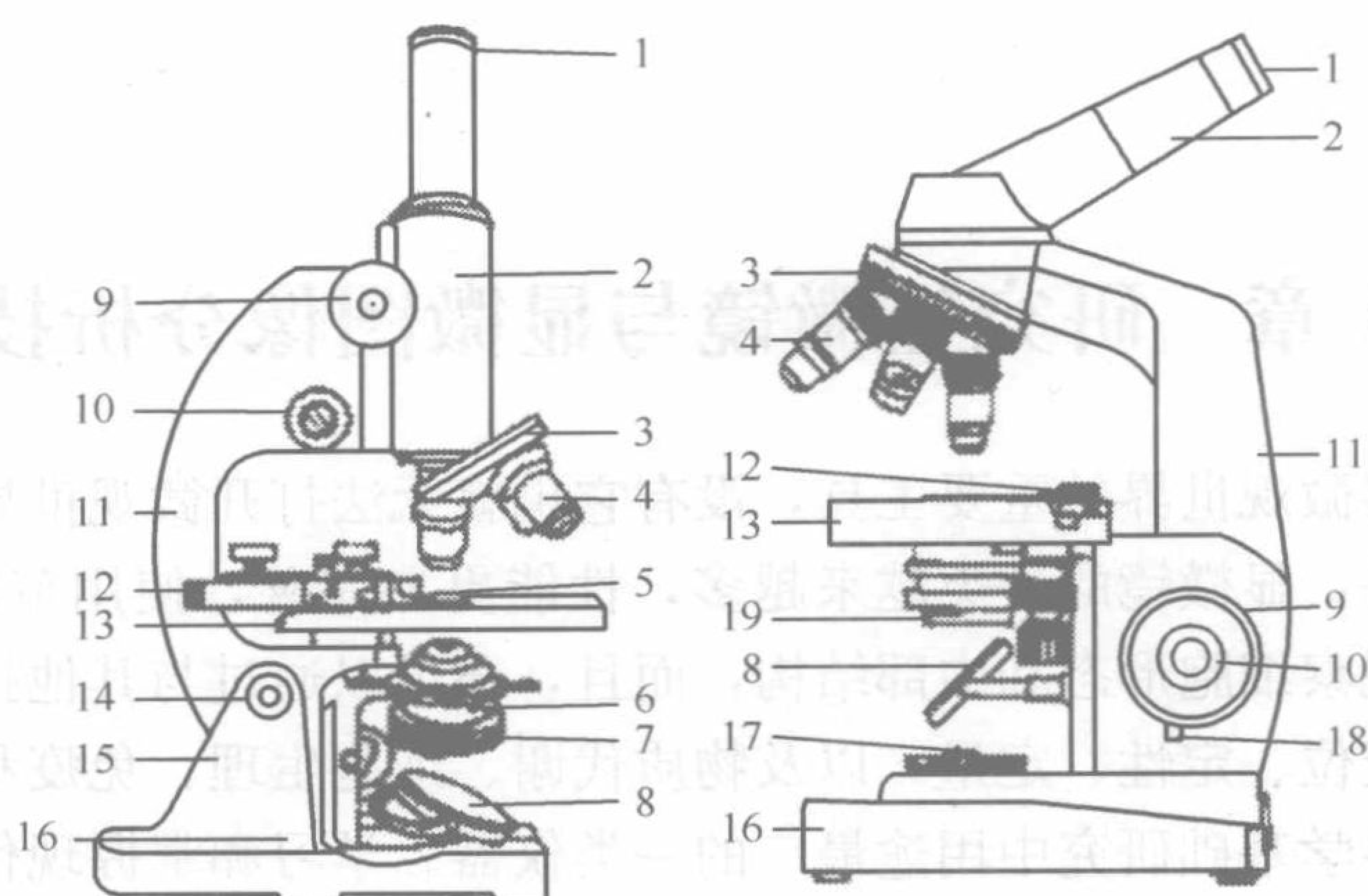


图 1-2　普通光学显微镜结构示意图

1. 目镜　2. 镜筒　3. 物镜转换器　4. 物镜　5. 通光孔　6. 聚光器　7. 光圈　8. 反光镜　9. 粗调节器　10. 细调节器　11. 镜臂　12. 移片器　13. 载物台　14. 倾斜关节　15. 镜柱　16. 镜座　17. 照明装置　18. 粗调限位环凸柄　19. 滤光片框

于观察。但使用时倾斜度一般不应超过 45°，以免失去重心而倾倒。镜筒倾斜式显微镜由于镜臂和镜柱连为一体，故无此关节。

(4) 镜筒（light tube）：位于镜臂前方的圆筒，上端安装目镜，下端装有旋转盘。根据镜筒的数目，光镜可分为单筒式和双筒式两类，单筒式又分直立式和倾斜式两种，而双筒式的镜筒均为倾斜的。

(5) 载物台（stage）：在镜筒下方，方形或圆形，用于放玻片标本。载物台中央有一圆形通光孔，两旁各有一压片夹。有的载物台上装有标本移动器，移动器上装有弹簧夹，用于固定标本片。移动器的一侧有两个旋钮，转动旋钮可使玻片前后左右移动。

(6) 物镜转换器（旋转盘）（nosepiece）：圆盘状，在镜筒下方，其上装有 3～4 个放大倍数不同的物镜。旋转物镜转换器可更换物镜。物镜转换器的内缘有一“T”形卡，用于对准和固定物镜位置，使物镜和光轴同心（合轴）。

(7) 调节器（regulator）：组装在镜臂前方或镜柱两侧的一对大小旋钮，为调节焦距之用。

大旋钮为粗调节器，转动粗调节钮可使镜筒（或载物台）升降，调节焦距。旋转一周可使镜筒（或载物台）升降 10mm。一般用于低倍镜调焦。

小旋钮为细调节器，转动细调节钮可使镜筒（或载物台）缓慢升降，每旋转一周约使镜筒（或载物台）升降 0.1mm。适用于高倍镜、油镜或分辨物像清晰度调焦。

2）照明部分

(1) 反光镜（reflecting mirror）：载物台下方，镜柱前面的一个圆镜。一面为平面，一面为凹面。平面镜聚光力弱，适于强光源和平行光源。凹面镜聚光力强，适用于弱光源或散射光源。反光镜的方位可以随意调节。

(2) 聚光器（condensor）：在载物台下方，由一组透镜组成，可使反射光线聚集于标本上。一般在镜柱一侧有一旋钮，可使聚光器升降，与物镜配合使用。

(3) 光圈（aperture）：在集光器下方，由一组活动金属片组成，构成一个可开可

缩的孔。在其外侧有一小柄，可以调节控制光线通过。在光圈的下方常装有滤光片框，可以放置不同颜色的滤光片。

3）光学部分

（1）目镜（eyepiece）：短圆筒状，装在镜筒上端，其上刻有放大倍数，每台显微镜常备有3～4只放大倍数不同的目镜，如5×、10×、15×等。眼睛通过目镜观察物像。

（2）物镜（objective）：装在物镜转换器上的一组镜头，一般有低倍镜、高倍镜、油镜三种。每个物镜上刻有相应的标记。低倍镜筒上刻有10×或15×等标志，高倍镜筒上刻有40×或45×标志。油镜上一般为100×。N. A. 表示镜口率，镜口率反映镜头分辨力的大小，其数字越大，表示分辨力越高（图1-3）。

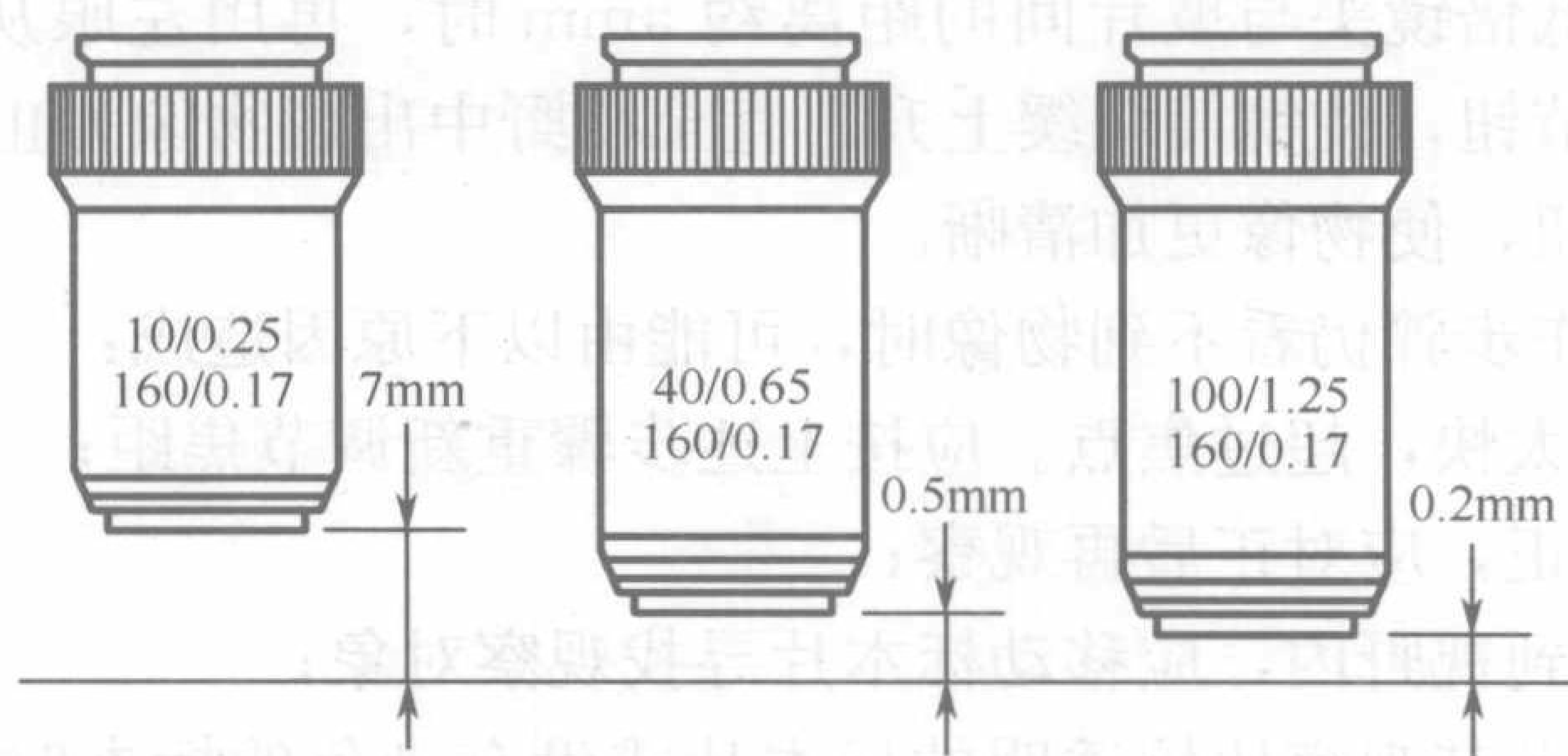


图1-3　三种物镜及其工作距离

三种物镜的比较见表1-1。

表1-1　三种物镜的比较

镜头	镜身	镜面	放大倍数	镜口率	工作距离/mm
低倍镜	短	大	10	0.3	7
高倍镜	较长	较小	40	0.5	0.5
油镜	长	小	100	1.25	0.2

注意：分辨力（resolving power）：也叫分辨率或分辨本领，指能把两个物点分开的最小距离的能力。这两点之间的距离即为其分辨力，这个距离越近，其分辨率越高。显微镜的分辨力依下列公式计算：

$$R = 0.61\lambda/\text{N. A.} \quad (\text{N. A.} = n\sin\theta)$$

式中：R为分辨力；N. A. 为镜口率；n为介质的折射率；$\sin\theta$为透镜视锥半顶角的正弦；λ为光波波长。

放大倍数的计算：实物放大倍数＝物镜放大倍数×目镜放大倍数

2. 显微镜的使用方法

1）低倍镜的使用

（1）检查：右手握镜臂，从镜箱内取出显微镜，左手托镜座，轻轻放在实验桌上。先检查一下显微镜各部件有无损坏，如发现有损坏或性能不良者，立即报告，请求处理。

(2) 准备：将显微镜放于前方略偏左侧，必要时使镜筒倾斜（有的显微镜本身已经倾斜）以便观察。转动粗调节钮，将镜筒略升高（或将载物台下降）使物镜与载物台距离略拉开。再旋转物镜转换器，将低倍镜对准载物台中央的通光孔（可听到“咔哒”声）。

(3) 对光：打开光圈，上升聚光器，双眼同时睁开，以左眼向目镜内观察，同时调节反光镜的方向，直到视野内光线明亮均匀为止。反光镜的平面镜易把其他景物映入视野，一般用凹面镜对光。

(4) 放标本片：标本片的盖片朝上，将标本片放到载物台前方，然后推到物镜下面，用压片夹压住，如有标本移动器，可用上面的弹簧夹夹住标本片，然后把要观察的部分移到通光孔的正中央。

(5) 调节焦距：从显微镜侧面注视物镜镜头，同时旋转粗调节钮，使镜筒缓慢下降（或镜台上升），在低倍镜头与玻片间的距离约 5mm 时，再用左眼从目镜里观察视野，左手慢慢转动粗调节钮，使镜筒缓缓上升，直至视野中出现物像为止。如果物像不太清晰，可转动细调节钮，使物像更加清晰。

如果按上述操作步骤仍看不到物像时，可能由以下原因造成：

① 转动调节钮太快，超过焦点。应按上述步骤重新调节焦距；

② 物镜没有对正，应对正后再观察；

③ 标本没有放到视野内，应移动标本片寻找观察对象；

④ 光线太强，尤其观察比较透明的标本片或没有染色的标本时，容易出现这种现象。应将光线调暗一些后，再观察。

2）高倍镜的使用

(1) 依照上述操作步骤，先用低倍镜找到清晰物像。

(2) 将需要观察的部分移到视野的中央。

(3) 眼睛从侧面注视物镜，用手移动转换器，换高倍镜。

(4) 眼睛向目镜内观察，同时微微上下转动细调节钮，直至视野内看到清晰的物像为止。

如按上述操作仍看不到物像时，可能由下列原因造成：

① 观察的部分不在视野内，应在低倍镜下寻找到后，移到视野中央，再换高倍镜观察；

② 标本片放反了，应把标本片放正后，再按上述步骤操作；

③ 焦距没调好，应仔细调节焦距。

有的显微镜高倍镜与低倍镜不配套，从低倍镜转换高倍镜时，往往转不过来或撞坏标本，如遇到这种情况，可把镜筒略升高（或载物台下降），直接用高倍镜调焦。方法是：从侧面注视物镜，调节粗调节钮，使高倍镜头下降至与标本片最短距离，再观察目镜视野，慢慢调节细调节钮，使镜头缓缓上升，直至物像清晰为止。

如需要更换标本片时，应该先把镜筒升高（或载物台下降），然后把标本片移到载物台前方，再取下。

3）油镜的使用方法

(1) 先按低倍镜到高倍镜的操作步骤找到物像，把要放大观察的部分移到视野中央。

(2) 把高倍镜移开，在标本片上滴一滴香柏油，眼睛从侧面注视镜头，轻轻转换油镜，使镜面浸在油滴中。在一般情况下，转过油镜即可看到物像，如不清楚，可来回调动细调节钮，即可看清物像。如仍看不清，再按上述步骤操作。

(3) 找到物像后，再调节聚光器和光圈，选择最适光线。

(4) 油镜使用完毕后，上升镜头约10mm，把镜头转到一边，用擦镜纸把镜头擦净。如仍擦不干净，可用擦镜纸醮少许二甲苯轻擦，然后再用干净的擦镜纸擦一遍。

(5) 有盖片的标本片，可用擦镜纸醮少许二甲苯，把油擦净。无盖片的标本片，可用拉纸法擦油。方法是：先把一小张擦镜纸盖在油滴上，再滴上二甲苯，平拉擦镜纸，反复几次即可擦净。也可以在二甲苯中把油洗去晾干。

4) 使用练习

低倍镜使用练习：取一张A字片，用低倍镜观察。练习对光、调焦，并注意观察物像与玻片移动方向是否一致，镜下观察的字母是正像还是反像？

高倍镜使用练习：取一张羊毛交叉片（染成红色），先用低倍镜观察，找到羊毛交叉点，移到视野中央，换高倍镜观察。调节焦距，注意观察上下羊毛的清晰度。

油镜使用练习：取一张人血涂片，先用低倍镜、高倍镜观察，再练习用油镜观察。注意比较三种物镜的放大倍数和分辨率有何不同？练习分辨红细胞、白细胞和淋巴细胞。练习擦洗油镜头和标本片。

【注意事项】

(1) 取显微镜时必须右手握住镜臂，左手托镜座，切勿一手斜提，前后摆动，以防镜头或其他零件跌落。

(2) 观察标本时，显微镜离实验台边缘应保持一定距离（5cm），以免显微镜翻倒落地。镜柱与镜臂间的倾斜角度不得超过45°，用完立即还原。

(3) 使用时要严格按步骤操作，熟悉显微镜各部件性能，掌握粗、细调节钮的转动方向与镜筒升降关系。转动粗调节钮向下时，眼睛必须注视物镜头。

(4) 观察带有液体的临时标本时要加盖片，不能使用倾斜关节，以免液体污染镜头和显微镜。

(5) 粗、细调节钮要配合使用，细调节钮不能单方向过度旋转，调节焦距时，要从侧面注视镜筒下降，以免压坏标本和镜头。

(6) 用单筒显微镜观察标本，应双眼同时睁开，左眼观察物像，右眼用以绘图，左手调节焦距，右手移动标本或绘图。

(7) 禁止随意拧开或调换目镜、物镜和聚光器等零件。

(8) 显微镜的光学部件不可用手指、纱布、手帕或其他粗糙东西擦拭，以免磨损镜面。需要时只能用擦镜纸擦拭。

(9) 凡有腐蚀性和挥发性的化学试剂和药品，如碘、酒精、酸类、碱类等都不可与显微镜接触，如不慎污染时，应立即擦干净。

(10) 实验完毕，要将玻片取出，用擦镜纸将镜头擦拭干净后移开，不能与通光孔相对。用绸布包好，放回镜箱。切不可把显微镜放在直射光线下暴晒。

（车大年）

1.2 倒置相差显微镜的原理及使用

多年来，光学显微镜在细胞生物学研究领域中发挥了重要作用。随着现代生物学技术与光学显微镜技术的结合，进一步发展研制出了多种有特殊功能的光学显微镜，使光学显微镜的应用技术从单纯形态学研究扩展到动态研究细胞结构与功能关系的领域。相差显微镜是用来观察无色透明活细胞的结构及功能状态，倒置相差显微镜是当前细胞生物学科学研究中最常用的显微镜，主要用于观察正在培养的活细胞的生活特性，如细胞的生长、运动、发育、分裂、分化、衰老、死亡过程中细胞形态及其内部结构的连续变化。倒置相差显微镜与缩时连续摄影或摄像结合使用，可真实记录下这些渐变过程，比用"原始"的定时染色、切片观察记录再拼接起来的方法要完整、准确、真实。

【实验原理】

波长、频率、振幅、相位是所有波的四种基本属性。在人的视觉中，可见光波的波长（及频率）的变化，表现为颜色的不同，振幅变化表现为明暗的不同，而相位变化人眼是感觉不到的。当光通过透明的活细胞时，虽然细胞内部结构厚度不同，但波长和振幅几乎没有改变，只是相位有了差别，所以用普通的光学显微镜无法看清未经染色的活细胞的内部细节。

相差显微镜（phase contrast microscope）利用光的衍射和干涉特性，在普通光学显微镜中增加了两个部件：在聚光镜上加了一个环状光阑，在物镜的后焦面加了一个相板，从而使看不到的相位差变成以明暗表示的振幅差。因此，可以用来观察无色透明活细胞中的细节。

倒置显微镜（inverted microscope）的光学原理与普通光学显微镜原理基本相同，它们之间主要差别是倒置显微镜的光源安装在标本的上方，物镜装在标本的下方。因此，可以用来观察生长在培养瓶皿底部的细胞状态。它与相差装置配合，用来观察连续培养的活细胞。

【实验用品】

(1) 器材：倒置相差显微镜、细胞培养用品、擦镜纸、吸水纸、载玻片、盖玻片等。

(2) 试剂：培养细胞用液。

(3) 材料：培养细胞。

【方法与步骤】

1. 相差装置的调节（图 1-4）

(1) 首先将显微镜合轴。

(2) 把视野光圈开大至与聚光器光阑边缘一致。

(3) 将与物镜放大倍数一致的相板插入光路（有的相板固化在物镜中就不需再插入相板），选用与物镜放大倍数一致的相环插入（有的是旋入）聚光器中。

(4) 把调中目镜换入目镜筒中，旋动调中目镜上的调焦环至相板相环的图像清晰（它们分别是明暗的两个圆环图像）。

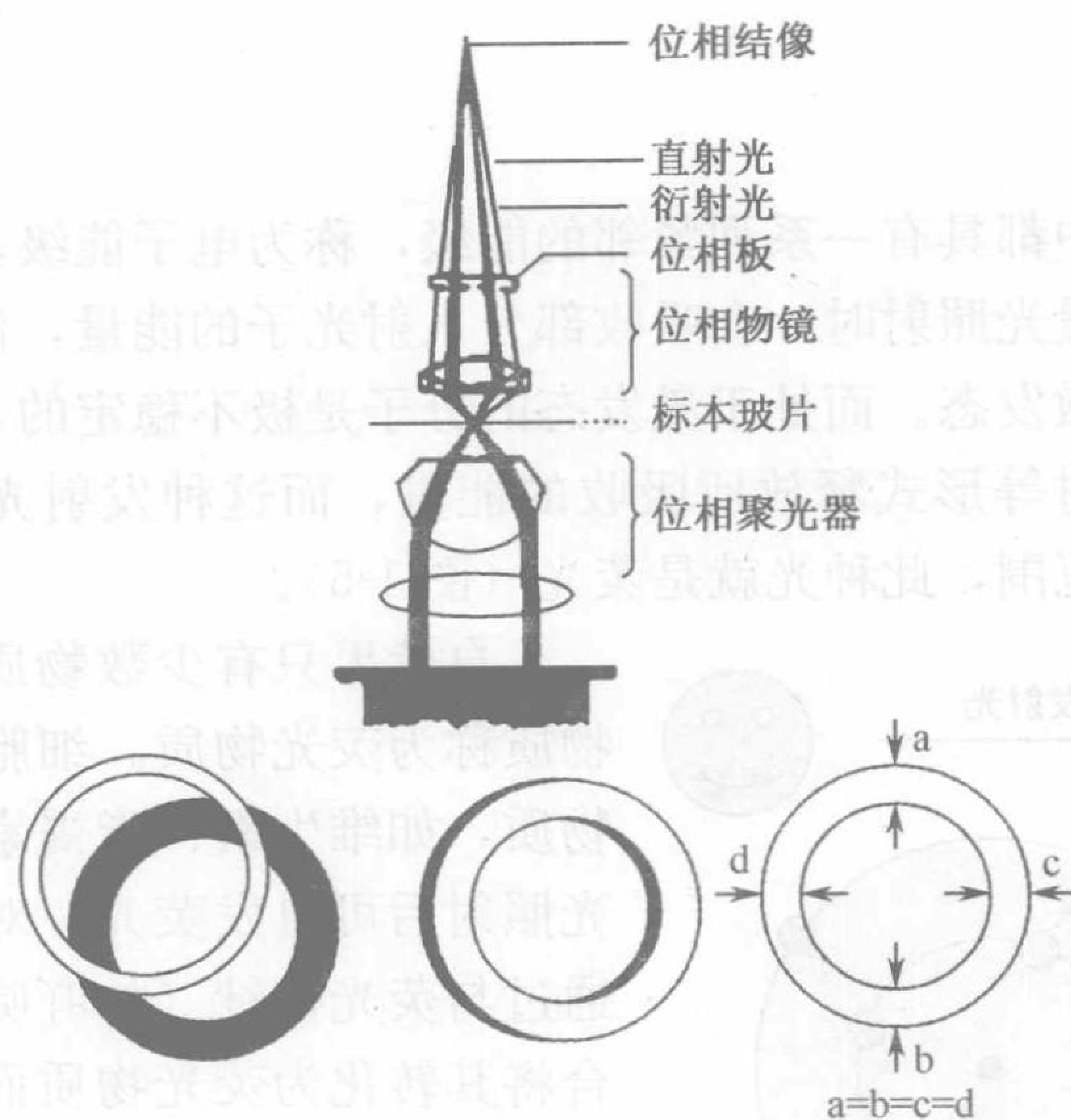


图 1-4　相差显微镜示意图及合轴位相环

(5) 调节聚光器上的相环调中螺钮（注意不要旋动聚光器的调中钮），使两个圆环图像重叠成同心圆状态。此时的相差装置就调节好了。换回目镜即可用于观察。

注意：当换不同倍率的物镜时，都要选用相一致的相板和相环，并重新调中。否则，相差显微成像效果不佳。

【注意事项】

(1) 载玻片或培养瓶必须平整、均匀；标本不能太厚，否则相差显微成像效果不好。

(2) 标本要在有水的环境中（如培养瓶中有培养液），要用水封片等，成像效果才明显。

(3) 载玻片、培养瓶的表面要干净，否则观察的视野中显示许多小的圆斑，影响观察效果。

(4) 光路上最好加单色滤光片，如黄绿色滤光片，在此单色光下，相差显微镜的分辨力最高。

（车大年）

1.3　荧光显微镜的原理及使用

荧光显微镜（fluorescence microscope）是一种常用的光学研究显微镜，其基本原理是利用一定短波长的激发光作为光源对样品进行激发，使之产生一定波长的可见光——荧光，再经显微镜成像系统的放大作用显示标本中的某些化学成分和细胞组分，从而对样品结构或其组分进行定性、定位、定量检测。

【实验原理】

1. 荧光

每种物质的分子中都具有一系列紧邻的能级，称为电子能级，电子在其相应的能级中运动。物质受高能量光照射时，会吸收部分入射光子的能量，使电子从低能级向较高能级跃迁，变成电子激发态。而处于激发态的分子是极不稳定的，其中的高能电子会返回基态，同时以光辐射等形式释放所吸收的能量，而这种发射光的波长比激发光波长长，大多处于可见光范围，此种光就是荧光（图 1-5）。

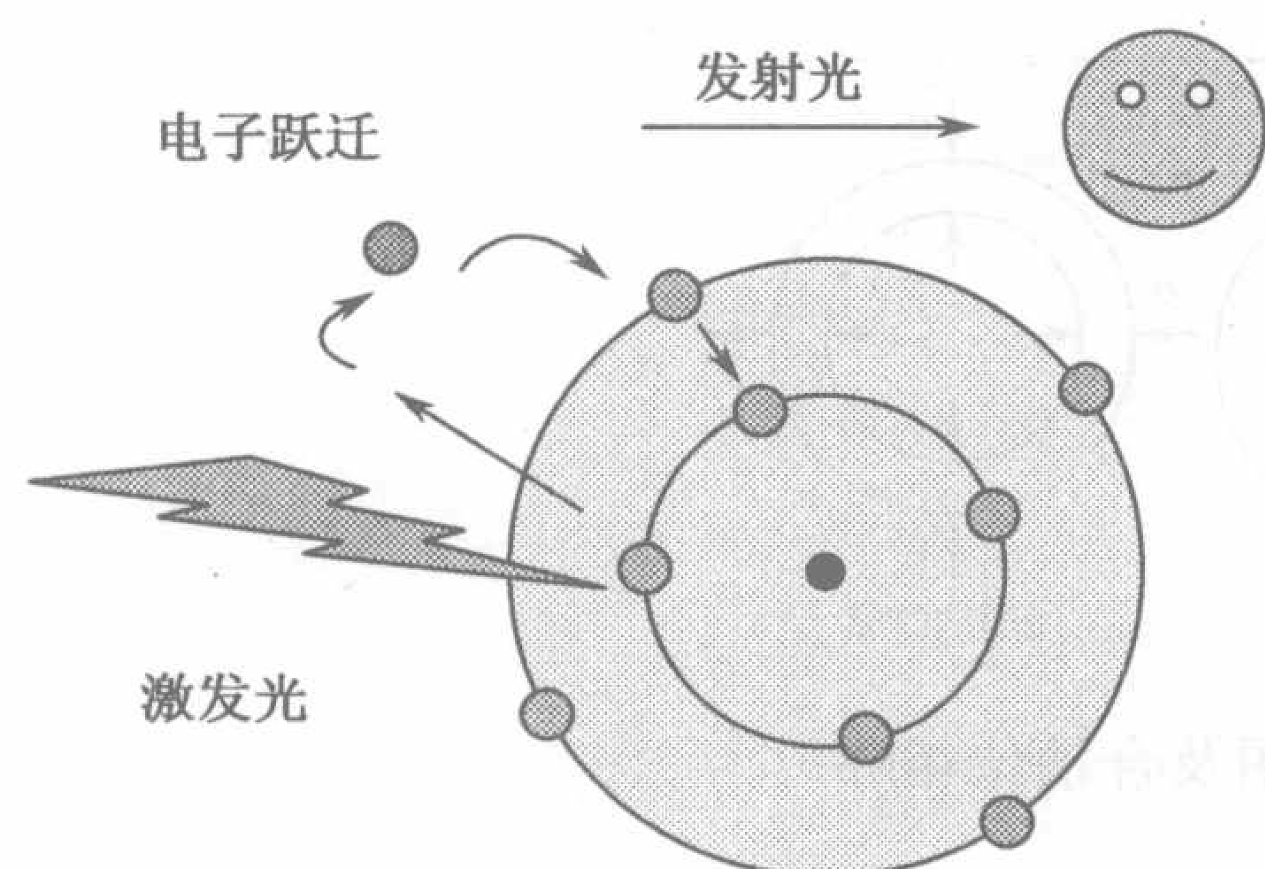


图 1-5 荧光产生的原理

自然界只有少数物质能够自发荧光，这种物质称为荧光物质。细胞内含有少数天然荧光物质，如维生素、脂褐素、核黄素等，经短波光照射后可自发荧光。对于非荧光物质，可以通过与荧光探针（如吖啶橙等荧光色素）的结合将其转化为荧光物质而显示出荧光，此过程就是荧光标记。荧光色素是能吸收激发光的光能产生荧光并能作为染料使用的有机化合物。有些荧光色素可直接与欲显示的细胞中物质以特异性的高亲和力结合，使之发出荧光，如吖啶橙与 DNA 及 RNA 有特异性亲和力；有些荧光色素结合于抗体或抗原上用于显示目的抗原或抗体，如异硫氰酸荧光素（FITC）。不同荧光染料具有不同的最大吸收波峰和最大发射波峰，从而可发射出不同颜色的荧光。

荧光物质发出的荧光能量非常弱，必须借助特殊设计的显微放大装置——荧光显微镜才能观察到这些荧光物质在细胞内的分布。通过荧光显微镜的短波光源激发荧光素或某些物质产生发射光——荧光，并予以接收和呈现。

2. 荧光显微镜的结构

1）荧光显微镜的设计原理

（1）必须将光源中特定波长的激发光分离出来，使其直接照射到标本上以产生荧光。

（2）必须在产生的荧光与部分未被吸收激发光的混合光中，将荧光单独分离出来。

2）荧光显微镜的结构特点

荧光显微镜有透射式和落射式两种类型。前者的激发光来自被检物体的下方，较难操作，不适用于非透明的被检物；新型的荧光显微镜多为落射式，光路中具有分光镜，光源来自被检物上方，对透明及非透明物都适用，可以实现整个视场的均匀照明。

荧光显微镜在装置上的重要部件就是要有能提供充分的特定波长的光源装置，使被检物体得到理想的激发而发出强的荧光。为此，其主要由光源、滤光片系统、光学系统等结构组成。根据物镜镜头的位置，荧光显微镜可分为正置与倒置两种，但其涉及荧光成像的结构相似。这里以正置荧光显微镜为例介绍其结构。

（1）光源：荧光必须由高能量的短波光（紫外光或蓝紫光等）激发产生，荧光显微

镜一般采用 200W 的超高压汞灯作光源，光源辐射出各种波长的光（从紫外到红外），包括丰富的短波光，足以激发各类荧光物质。高压汞灯有一定的使用寿命，打开高压汞灯后不可立即关闭，以免水银蒸发不完全而损坏电极；关闭汞灯后也不能马上开启，应待灯泡温度降低后再重新开启，一般均需要等待 15～30min。

（2）滤光片系统：滤光片系统（即滤色块）由激发滤光片、二向色镜（分光镜）、阻断滤光片三部分组成。

激发滤光片位于光源和标本之间，对于光源发出的混合光选择透过能使标本产生荧光的特定波长的光（如紫外光、蓝光或绿光），同时阻挡掉与激发荧光无关的光。二向色镜和照明光路成 45°角设置，它对激发光波区的光（即透过激发滤光片的光）有很高的反射率，而对由标本发出的荧光波长区的光，则有很高的透射率，即二向色镜起着反射激发光和透过荧光的重要作用。

二向色镜和激发滤光片相组合，并不能把激发光和荧光完全分离开来，因此位于标本与目镜之间的阻挡滤光片是用来阻挡掉没有被标本吸收的激发光并有选择地透过荧光，这样既有利于增强反差，又可保护眼睛免受紫外线的损伤，滤光片系统功能见图 1-6。不同被检物或荧光素具有不同的最佳激发波长，滤光片（包括激发滤光片和阻挡滤光片）的选择与荧光色素的选择最好匹配，才能得到最接近真实的结果和最佳拍摄效果。由于荧光显微镜产生的是暗视野，使得荧光在暗背景上呈现好的反衬度，更易于观察。

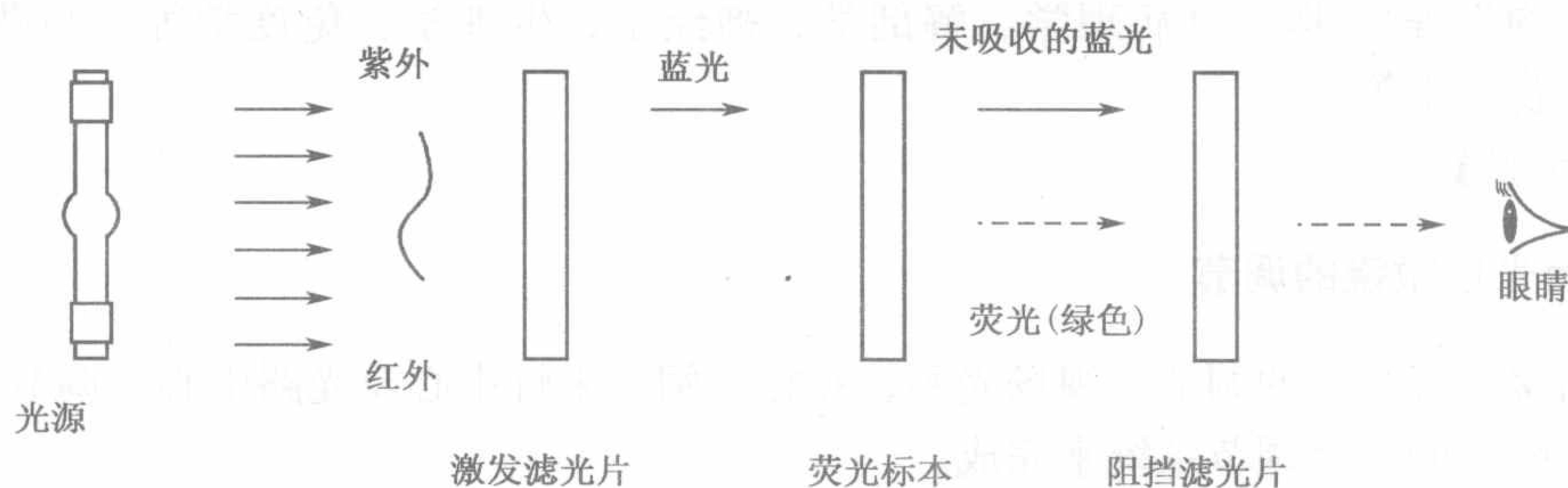


图 1-6　荧光显微镜滤光片的功能

（3）光学系统：新型荧光显微镜光学系统的特点是采用落射光和暗视野。落射光的优点是所采用的二向色镜同时具有反光镜和分光滤镜的作用，短波光遇滤镜镀膜而反射，长波光则能垂直射向物镜，激发标本。由于暗视野聚光器等部件只允许荧光进入目镜，所以形成了黑色背景，使荧光鲜明，提高了反衬度、灵敏度和清晰度。荧光显微镜结构见图 1-7。

3）荧光显微镜的优点和用途

荧光显微镜具有染色简便、标本色彩鲜艳、敏感度高、特异性强、对细胞的刺激小及能进行多重染色等优点，同时它不仅可以观察固定的切片标本，而且还可以进行活体染色观察。荧光显微镜技术通常用于检测与荧光染料共价结合的特殊蛋白质或其他分子，由于它灵敏度高，用极低浓度（ppm 级）荧光染料就可清楚地显示细胞内特定成分，故可进行活体观察。因此，可以用来观察活细胞内物质的吸收与运输，化学物质的分布与定位等。

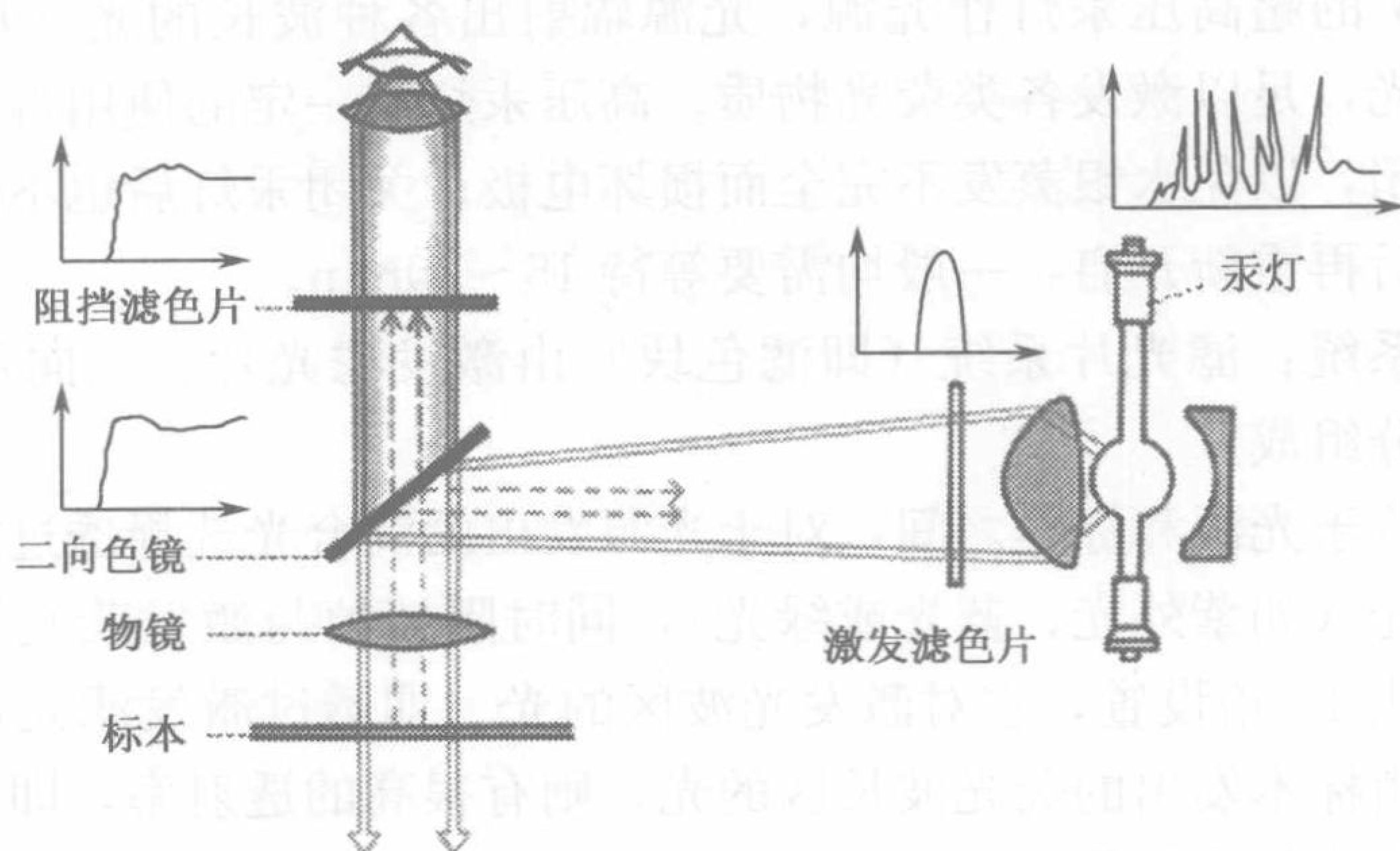


图 1-7　荧光显微镜的结构示意图

近年来发展起来的免疫荧光显微技术，可用荧光素标记抗体，利用抗体与细胞表面或内部大分子（抗原）的特异性结合，在荧光显微镜下对细胞内的特异成分进行精确定位研究。该技术与分光光度计结合构成的显微分光光度计，可对细胞内物质进行定量分析，精确度高。

荧光显微镜技术在生命科学研究中多应用于对细胞结构或组分的定性、定位、半定量研究。在生命科学研究领域已被广泛应用，应用范围包括：生物学（动物学、植物学、微生物学等）、医学（病理学、解剖学、神经学、生理学、免疫学等）与药剂学、化学、生物化学等。

【方法与步骤】

1. 荧光显微镜的调节

包括聚光镜高度的调节，视场光阑、孔径光阑、汞灯中心及光路中心的调节可借助显微镜上配置的一套调节系统来完成。

2. 荧光显微镜的使用（以正置荧光显微镜为例）

（1）开启电源。

① 打开电源开关，当稳压器电压表的指针稳定在 220V 时再进行下一步操作。

② 启动高压汞灯：按启动键，汞灯即可燃亮。若尚未燃亮，可多按几次直至燃亮。等待约 10min 汞灯达稳定状态后，再进行操作。

（2）将荧光光路中的阻光光闸（SHUTTER）关闭，旋转滤色块转盘至空白处，开明场电源，调到适宜的光亮度，将含有荧光物质的标本片放置在载物台上，选择一定倍数的物镜，如 10×物镜，调焦到标本清晰。

（3）关闭明场光源，旋转滤色块转盘选择对应于所选激发光波长的滤片组（一般“1”对应紫外光，“2”对应蓝光，“3”对应绿光，还可设置其他特殊滤色块），打开光闸，激发光进入光路，调焦到荧光图像清晰。

（4）调节载物台位置以更换视野，寻找满意的荧光图像。

（5）选择理想视野，立即用制冷 CCD 或其他显微图像拍摄设备进行拍摄和储存，

所拍摄的荧光图像亮度和对比度还可由曝光时间等参数控制。

【注意事项】

（1）观察对象必须是可自发荧光或已被荧光染料染色的标本，并且处理标本的其他试剂应本身不会产生荧光。

（2）荧光显微镜要在光线尽量暗的环境下进行观察。

（3）使用荧光显微镜时要注意不要直接观察激发光源。较长时间观察荧光标本时，最好戴能阻挡紫外光的护目镜，加强对眼睛的保护。

（4）载玻片、盖玻片及镜油应不含自发荧光杂质。

（5）选用与荧光色素最佳匹配的滤片组。

（6）荧光染色的标本一般不能长久保存，若持续长时间照射（尤其是紫外光）易很快淬灭。因此，如有条件则应先照相存档，再仔细观察标本。

（7）启动高压汞灯后，不得在15min内将其关闭，一经关闭，必须待汞灯冷却后方可再开启。严禁频繁开闭，否则，会大大降低汞灯的寿命。

（8）若暂不观察标本时，可上过阻光光帘阻挡光线。这样，既可避免对标本不必要的长时间照射，又减少了开闭汞灯的频率和次数。

（9）同样放大倍数的物镜中，尽量选择油镜观察，可得到更加清晰的图像。

（赵玲）

1.4　激光扫描共聚焦显微镜技术

共聚焦扫描显微镜（confocal scanning microscope）最早是由马尔文·明斯基（Marvin Minsky）于1955年发明并申请专利，早期的显微镜没有使用激光光源，无法扫描到好的图像。后来经过几十年的不断发展与改进，20世纪80年代，激光扫描共聚焦显微镜（laser scanning confocal microscope，LSCM）成为技术成熟的高科技新产品。

LSCM是在荧光显微镜成像基础上加装了激光扫描装置，利用计算机进行图像高速采集和处理，把光学成像的分辨率提高了30％～40％，使用紫外或可见光激光激发荧光探针，从而得到细胞或组织内部微细结构的荧光图像，在亚细胞水平上观察诸如Ca^{2+}、pH、膜电位等生理信号及细胞形态的变化，成为在组织形态学、细胞生物学、分子生物学、药理学、神经科学、遗传学等领域中十分重要的研究工具。激光共聚焦成像系统能够用于观察各种染色、非染色和荧光标记的组织和细胞等，能够进行活体细胞中离子和pH变化研究、神经递质研究、细胞骨架研究、基因表达定位研究、荧光原位杂交研究（FISH）、原位实时PCR产物分析、荧光漂白恢复研究（FRAP）、蛋白质研究、胞间通信研究、膜电位与膜流动性等研究，进行图像处理和三维重建等分析。

激光扫描共聚焦显微镜由于其高分辨率、高灵敏度、三维重建等特点，在细胞水平上可进行多种功能测量和分析，成为分析细胞学的一项重要研究手段。随着LSCM设备和应用技术的不断完善，它在生物医学和生命科学领域里将起到更加重要的作用。

【实验原理】

激光扫描共聚焦显微镜是采用激光作为光源，在传统光学显微镜基础上采用共轭聚焦原理和装置，并利用计算机对所观察的对象进行数字图像处理的一套观察、分析和输出系统。激光扫描共聚焦显微镜主要系统包括激光光源、自动显微镜、扫描模块（含共聚焦光路通道和针孔、扫描镜、检测器）、数字信号处理器、计算机及图像输出设备（显示器、彩色打印机）等。通过激光扫描共聚焦显微镜，可以对观察样品进行断层扫描和成像。因此，科研人员可以无损伤地观察和分析细胞的三维空间结构。同时，激光扫描共聚焦显微镜也是活细胞的动态观察、多重免疫荧光标记和离子荧光标记观察的强有力工具。

1. 共聚焦成像原理

传统的光学显微镜使用的是场光源，标本上每一点的图像都会受到邻近点的衍射或散射光的干扰。图 1-8 显示，激光扫描共聚焦显微镜利用激光束经照明针孔形成点光源对样本内焦平面的每一点扫描，样本上的被照射点，在探测针孔处成像，由探测针孔后检测器如光电倍增管（photomultiplier tube，PMT）或冷电偶器件（charge-coupled device，CCD）逐点或逐线接收，迅速在计算机监视器屏幕上形成荧光图像。照明针孔与探测针孔相对于物镜焦平面是共轭的，这也是共聚焦（confocal）名称的由来；与聚焦平面共轭的针孔可避免来自检测器之外的光，即从聚焦平面以外的其他地方反射/发射过来的光被过滤掉；焦平面上的点同时聚焦于照明针孔和发射针孔，焦平面以外的点不会在探测针孔处成像。

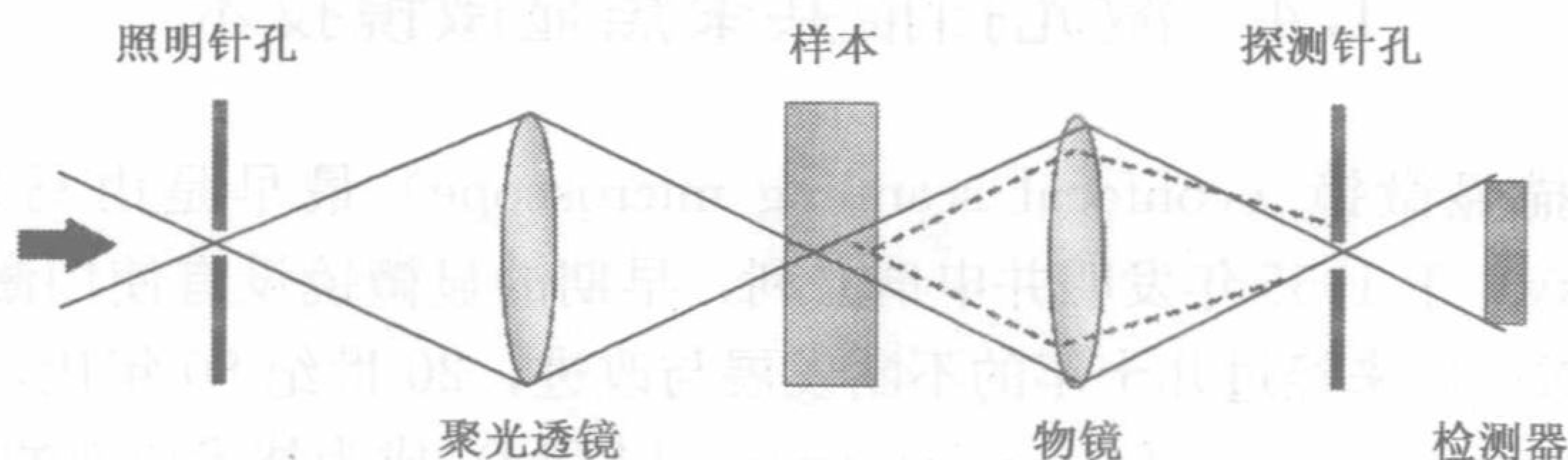


图 1-8　共聚焦图像形成原理示意图

共聚焦光学系统由于使用照明点和探测点共轭这一独特结构，从而有效抑制同一焦面上非测量点的杂散光，大大减少测量的杂散光，有限度地改善横向分辨率，同时也具有纵向分辨力，也能够实现对快速运动和变化的样本进行观察，因而具备了时间分辨力。在显微镜的载物台上加一个微量步进马达，控制载物台的升降，可使载物台上下步进移动，细胞或组织各个横断面的图像都能清楚地显示，可对样本进行无损伤的光学切片。通过移动聚焦平面，可以将一个个的图像（光学切片）合并起来，组合成可在后期进行数字处理的三维堆栈，可以进行数字化的三维成像。

图 1-9 为激光共聚焦显微镜光路原理图，激光器发出的激光束（laser source）经过光的扩束和整形，变成一束直径较大的平行光束，主二色分光镜（main dichroic beam splitter）使光束偏转 90°，经过扫描镜（scanning mirror）会聚在物镜（objective lens）的焦点上，样本中的荧光物质在激光的激发下发出沿各个方向的荧光，一部分荧光经过物镜、扫描镜、主二色分光镜、聚焦透镜，会聚在聚焦透镜的焦点外，一部分经过焦点处的针孔（pinhole），由检测器（PMT：光电倍增管）接受并转变成电信号。从图 1-9

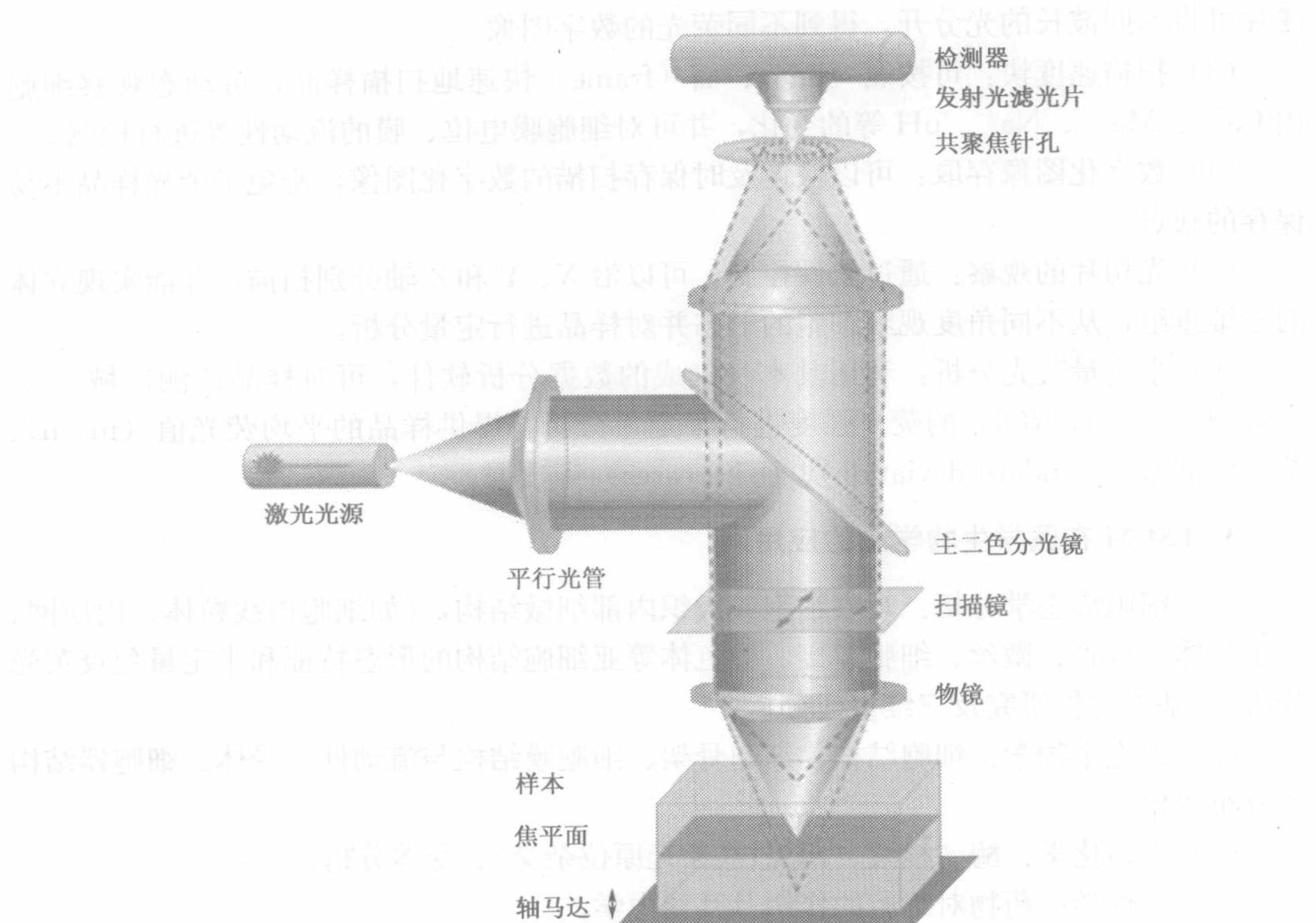


图 1-9　激光共聚焦显微镜光路原理图（Zeiss 公司提供）

中可以看出，只有在物镜的焦平面处发出的荧光才能够达到检测器（黄色光），样本中其他位置发出的荧光均被针孔阻挡掉（红色虚线光、蓝色虚线光）。由于物镜和会聚焦透镜的焦点在同一光轴上，因而称以这种方式成像的显微镜为共聚焦显微镜（confocal microscope），针孔是共聚焦显微镜与普通光学显微镜的最主要区别之一，它提供了仅从单平面收集光波的可能性，只有物镜焦平面处的切面才能成像。激光扫描显微镜可以按点和按线依次扫描样本，然后将像素信息组合成一个图像。通过这种方法，在 X，Y 和 Z 轴中成像的样本光学切片可具有很高的对比度和分辨率。

共聚焦显微镜的光分辨率以及 Z 轴上的光切厚度不但取决于光的波长，而且也取决于物镜的数值孔径和针孔的直径，其中针孔孔径的大小与分辨率成反比。

2. LSCM 的性能特点

激光扫描共聚焦显微镜与普通的荧光显微镜相比，无论在图像的分辨率、荧光信号的灵敏度等方面都得到大大提高，具体特点如下。

(1) 分辨率高：用激光扫描束经照明针孔形成点光源（而传统光学显微镜使用场光源），避免了标本上每一点的图像受到邻近点的衍射光或散射光的干扰；同时，消除了透镜的色差和球差。激光共聚焦显微镜观察的只是样本一个焦平面的图像，因此分辨率较高，约是普通显微镜的 1.4 倍。

(2) 灵敏度高：由于采用了光电倍增管，较弱的荧光信号也能检测到，利用不同的

滤片可将不同波长的光分开，得到不同荧光的数字图像。

(3) 扫描速度快：可按线（line）、面（frame）快速地扫描样品，可动态观察细胞内 Ca^{2+}、Mg^{2+}、Na^{+}、pH 等的变化，并可对细胞膜电位、膜的流动性等进行检测。

(4) 数字化图像存取：可以快速及时保存扫描的数字化图像，避免了荧光样品不易保存的缺点。

(5) 光切片的观察：通过软件控制，可以沿 X、Y 和 Z 轴分别扫描，并能实现立体的三维重组，从不同角度观察细胞的形态并对样品进行定量分析。

(6) 半定量荧光分析：利用其本身集成的数据分析软件，可对样品待测区域（region of interest，ROI）的荧光强度进行半定量分析，提供样品的平均荧光值（mean）、荧光标准差（standard deviation）、面积（area）等数据。

3. LSCM 在医学生物学上的应用

(1) 细胞形态学分析：观察细胞或组织内部细微结构，(如细胞内线粒体、内质网、高尔基体、微管、微丝、细胞连接、染色体等亚细胞结构的形态特征和半定量免疫荧光分析)、基因定位研究及三维重建分析。

(2) 细胞生物学：细胞结构、细胞骨架、细胞膜结构与流动性、受体、细胞器结构和分布变化。

(3) 生物化学：酶、核酸、FISH（荧光原位杂交）、受体分析。

(4) 药理学：药物对细胞的作用及其动力学。

(5) 生理学：膜受体、离子通道、细胞内离子含量、分布、动态变化。

(6) 神经生物学：神经细胞结构、神经递质的成分、运输和传递、递质受体、离子内外流、神经组织结构、细胞分布。

(7) 微生物学和寄生虫学：细菌、寄生虫形态结构。

(8) 病理学及临床应用：活检标本、肿瘤、自身免疫性疾病、HIV 诊断等。

(9) 遗传学和组胚学：细胞生长、分化、成熟变化、细胞的三维结构、染色体分析、基因表达、基因诊断。

【实验用品】

(1) 仪器：激光扫描共聚焦显微镜（如 Zeiss LSCM 510，Germany）。

(2) 试剂：根据检测内容确定。

(3) 样品：各种染色、非染色、荧光标记的组织（包括活组织）、培养细胞、黏附细胞、细胞涂片、石蜡切片、冰冻切片等。

【方法与步骤】

1. 标本制作的要求（培养的细胞、组织切片等样本）

绝大多数的组织切片、细胞样本都适用于 LSCM 观察，但对于细胞样本还需要注意，细胞必须是在贴壁后才能观察。细胞培养的方法与传统的细胞培养方法相同，最好使用带玻璃底的专用塑料细胞培养皿。细胞的贴壁处理可采用多聚赖氨酸（poly-L-lysine）法、蛋清（albumin，egg white）法、Cell-Tak 法等。

样本（除自发的荧光物质样本外）在进行 LSCM 观察前，还需要用荧光染料对待测定的物质进行标记。选择荧光标记物主要从以下 3 个方面考虑：测量仪器的激发光波

长、荧光探针的光谱性质和仪器所配备的荧光滤波片。

LSCM常用的激光光源有氩离子激光管（argon）：激发波长为458nm、488nm、514nm，其可使用的荧光探针为：绿色荧光蛋白（GFP）、Fluo-3/AM、Lucifer Yellow、BCECF-AM、异硫氰酸荧光素（FITC）、Cy2、吖啶橙（acridine orange，AO）等；氦氖激光管（HeNe）：激发波长为543nm，可使用的荧光探针有TRITC、Cy3、碘化丙锭（propidium iodide，PI）；激发波长为633nm，可使用的荧光探针有Cy5等。

2. LSCM扫描参数的选择

因LSCM属于大型精密仪器设备，一般需由专职技术人员负责操作、调试，以使仪器保持良好的工作状态。实验人员主要考虑实验目的和设计，制备样品，向技术人员提出检测观察的要求，以及对实验结果的分析研究等。但实验人员也应该了解LSCM工作、扫描时的一些基本要求。

（1）首先选择适合样本标记荧光探针的激发波长和发射波长，选择合适的滤波片。

（2）测量时选择合适的针孔（pinhole），需根据荧光信号的强弱及最佳的分辨率综合来调整。针孔越大，荧光信号越强，分辨率越弱；反之亦然。

（3）根据实验样本的要求，选择合适的扫描速度和存取图片大小，必要时还需要调节针孔（如做动态Ca^{2+}扫描时，就需要较大的针孔值、较快的速度和较小的存取图片）。

3. 基本操作步骤

（1）打开总电源，进入Zeiss LSCM 510软件系统，创建一个新的图像存储数据库，启动激光光源。

（2）切换到可视显微镜模式，首先用低倍镜定位待观测的视野（必要时可打开汞蒸气灯，用荧光显微镜定位）。

（3）切换到激光扫描模式，根据所标记的荧光探针不同，选择单通道或多通道扫描模式；选定与所标记荧光探针相适应的扫描配置；设置扫描参数，设定扫描像素、扫描速度、动态范围（dynamic range）；在通道设置中，调整针孔，获取图像；通过调节检测器增益（detector gain）、放大器补偿（amplifier offset）等，直到获取到最佳的图像。

（4）保存数据，选择合适的图像格式，输出图像。

（5）关闭激光器，等待Argon离子激光器完全冷却后，退出Zeiss LSCM 510系统，关闭总电源。

【结果与分析】

例1　大鼠心肌缺血再灌注TUNEL法检测心肌细胞凋亡（图1-10）

Wistar雄性大鼠，行心脏左冠状动脉结扎缺血及再灌模型，缓冲甲醛固定后，石蜡包埋切片，用荧光TUNEL检测试剂盒双标，PI标记大鼠心肌细胞核，FITC标记凋亡的细胞核。

例2　培养的肠上皮细胞波形蛋白的表达（图1-11）

例3　定量检测谷氨酸诱导的体外培养神经元内游离Ca^{2+}含量变化

以体外培养的孕14～15天胎鼠大脑皮层神经元为实验材料，实验设正常对照组和谷氨酸损伤组两组，每组细胞均以4×10^5个/ml密度接种在24孔培养板内，每孔接种1ml，每组设6个复孔。其中正常对照组正常培养48h，不做任何处理；谷氨酸损伤组

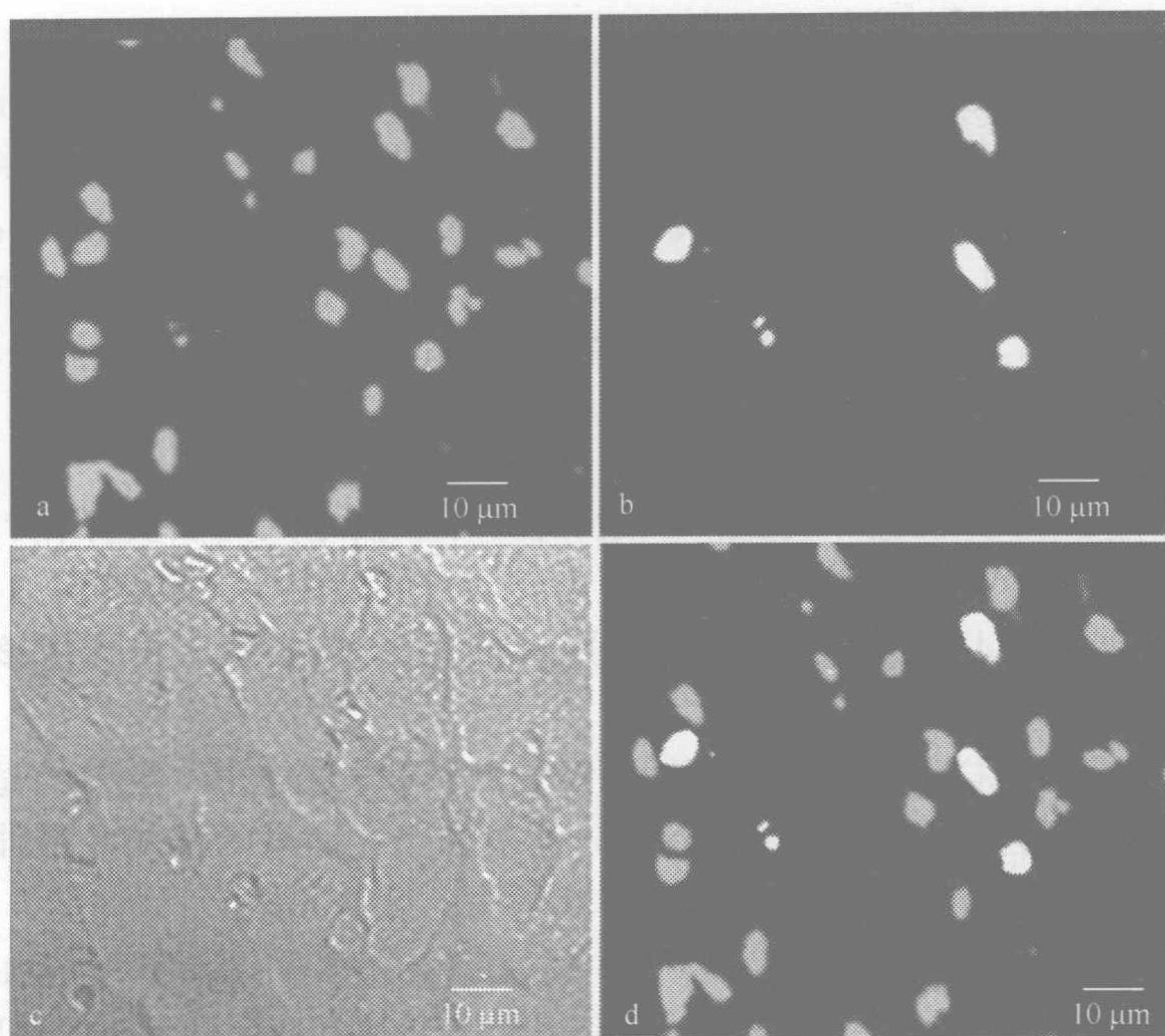


图 1-10　大鼠心肌缺血再灌注 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡

a. 红色荧光显示 PI 标记的大鼠心肌细胞核；b. 绿色荧光显示 FITC 标记的凋亡细胞核；c. 灰色显示透射光下大鼠心肌细胞图像；d. 显示的是图 a、b 的叠加图，图中黄色显示的是 PI 和 FITC 荧光叠加后的凋亡心肌细胞核

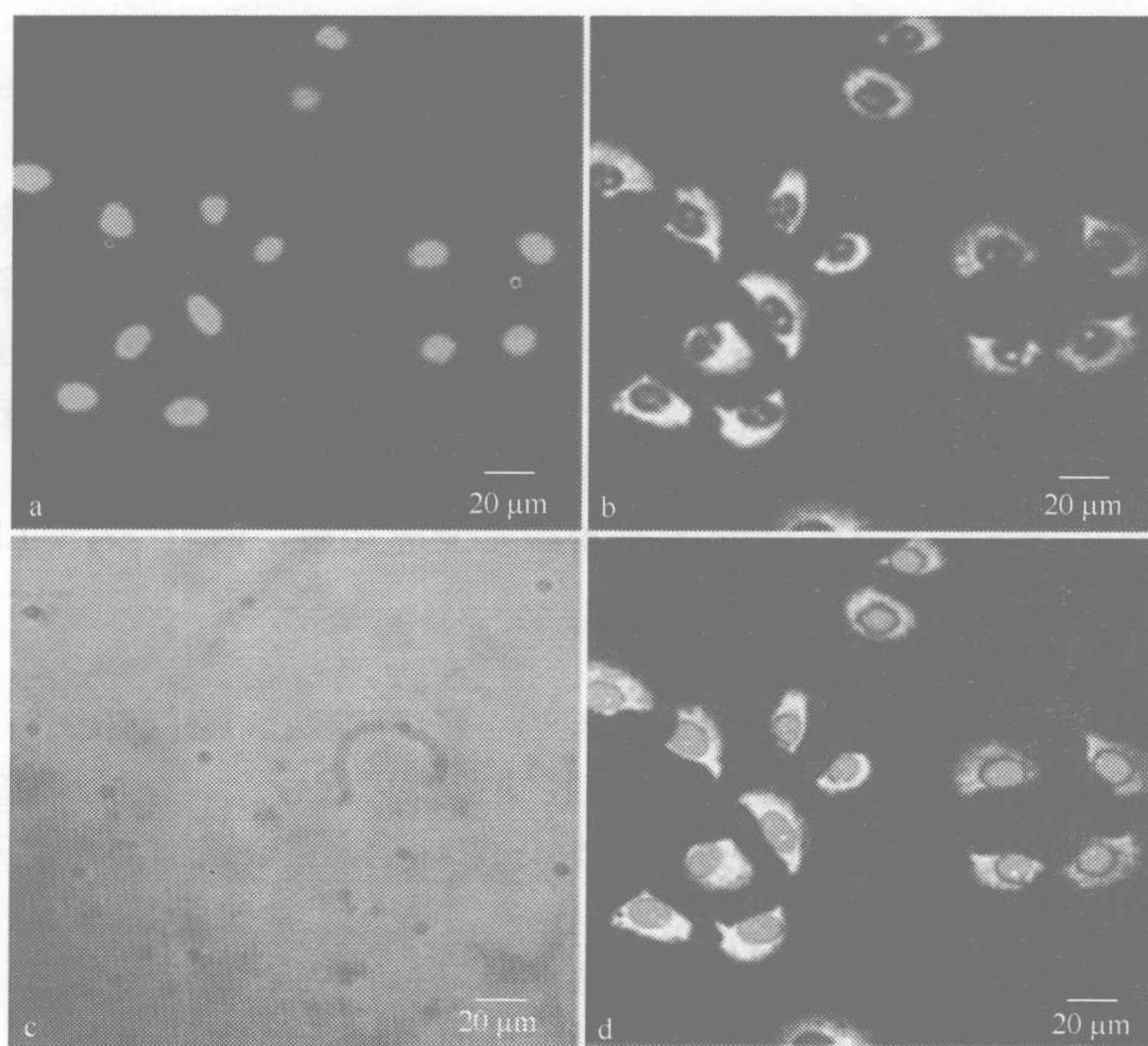


图 1-11　培养的肠上皮细胞波形蛋白的表达

a. 红色荧光为 PI 标记的肠上皮细胞细胞核；b. 绿色荧光为 FITC 标记的波形蛋白；c. 灰色显示的是透射光下培养的肠上皮细胞图像；d. 显示的是图 a、b 的叠加图

细胞接种 36h 后加入谷氨酸（glutamate，Glu，终浓度 2mmol/L），作用 12h 后检测（图 1-12）。

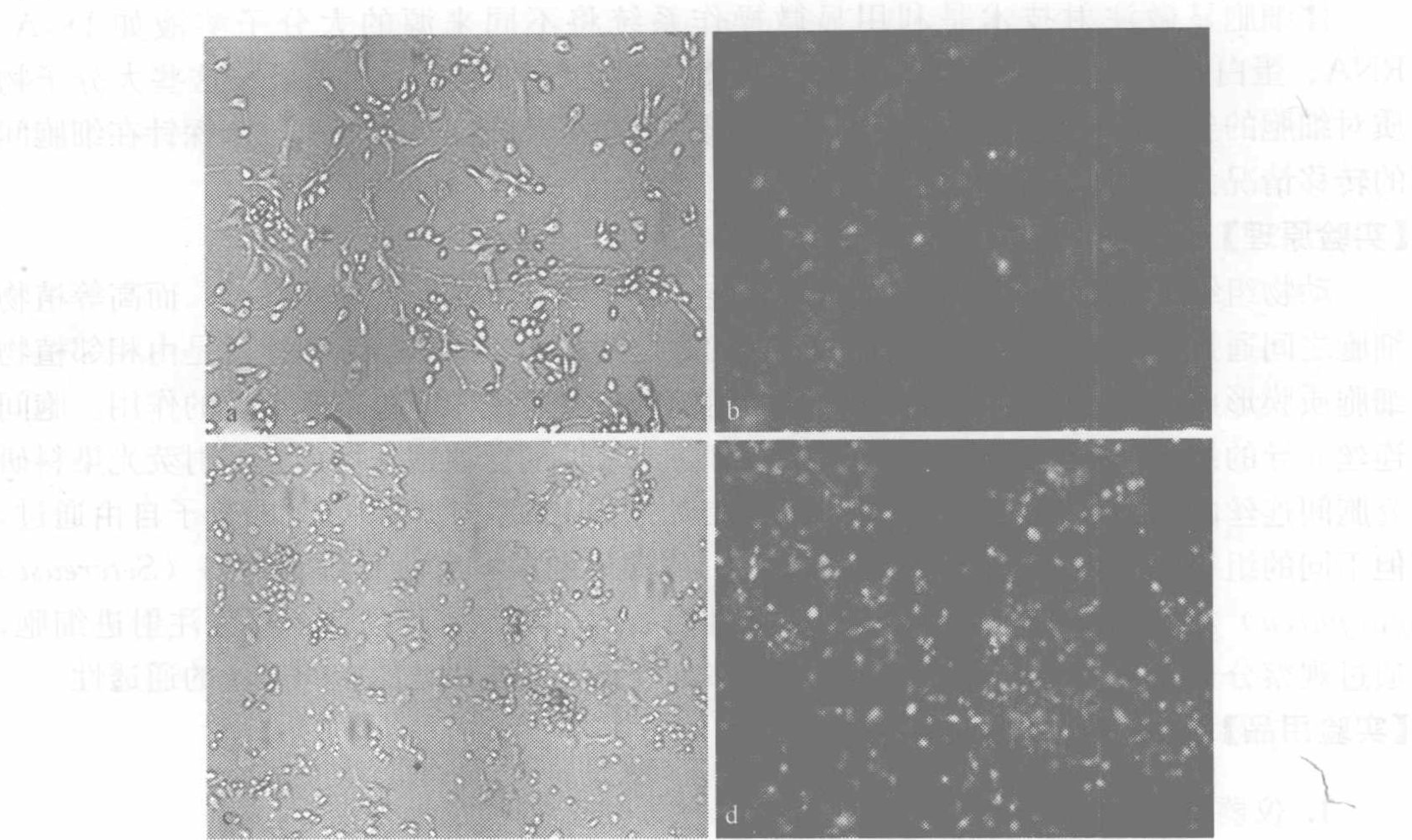


图 1-12　体外培养的神经元内游离 Ca^{2+} 定量检测（逯素梅提供）

a. 透射光下培养的正常神经元；b. 红色荧光显示与 Fluo-3 AM 结合后的正常神经元内游离 Ca^{2+}；c. 透射光下培养的谷氨酸作用后的神经元；d. 红色荧光显示与 Fluo-3 AM 结合后的 Glu 组神经元内游离 Ca^{2+}

（杨勇）

1.5　显微操作技术

显微操作技术（micromanipulation technique）是指在高倍复式显微镜下，利用显微操作器（micromanipulator）进行细胞或早期胚胎操作的一种方法。显微操作器主要是用来控制显微注射针或吸管（固定针管）在显微镜视野内精确移动的机械装置。

显微操作技术包括细胞核移植、显微注射、嵌合体技术、胚胎移植及显微切割等。细胞核移植技术已有几十年历史，自 1962 年 Gordon 等对非洲爪蟾进行核移植获得成功以来，已经广泛用于细胞核的全能性、可塑性、核质关系以及细胞的发育分化等方面的研究。显微注射技术的应用也很广泛，将外源目的基因注入受精卵的原核中，使外源基因整合到受体细胞的基因组内，再通过胚胎移植技术将整合有外源基因的受精卵移植到受体动物的子宫内发育，从而获得转基因动物，是目前建立转基因动物的重要方法。还可以通过向细胞内注射不同相对分子质量的探针，来研究细胞膜的通透性等。显微切割技术主要用于胚胎和染色体的显微切割等。显微操作技术已经成为细胞生物学、细胞遗传学、生化细胞学、胚胎发育以及基因工程等研究中的重要技术方法。

1.5.1 体细胞显微注射技术

体细胞显微注射技术是利用显微操作系统将不同来源的大分子溶液如DNA、RNA、蛋白质分子、抗体，以及荧光探针等注射到活细胞内，用来研究这些大分子物质对细胞的生命活动的影响。本实验将以细胞内注射荧光探针来观察分子探针在细胞间的转移情况为例，学习细胞显微注射技术。

【实验原理】

动物组织相邻细胞之间可以通过间隙连接装置实现细胞间的通信联系，而高等植物细胞之间通过穿越细胞壁的胞间连丝完成细胞之间的通信联络。胞间连丝是由相邻植物细胞质膜形成的管状通道，在细胞的物质运输和信号传递中起着非常重要的作用。胞间连丝介导的细胞间的物质运输是有选择性和可调节性的。通常采用显微注射荧光染料研究胞间连丝的通透性。胞间连丝可以允许相对分子质量为1×10^3以下的分子自由通过，但不同的组织细胞之间允许通过的分子大小还有区别。本实验利用紫竹梅（*Setcreasea purpurea*）雄蕊花丝毛为材料，运用显微注射技术，将不透膜的分子探针注射进细胞，通过观察分子探针在细胞间的转移情况，来判断花丝毛连接处的胞间连丝的通透性。

【实验用品】

1. 仪器

Olympus BH-2荧光显微镜；Opton显微操作仪；自制压力显微注射器（图1-13）；Narishige PE-2拉针仪；玻璃注射针头（可购买厂商拉制好的商品，也可用拉针仪自行拉制）。

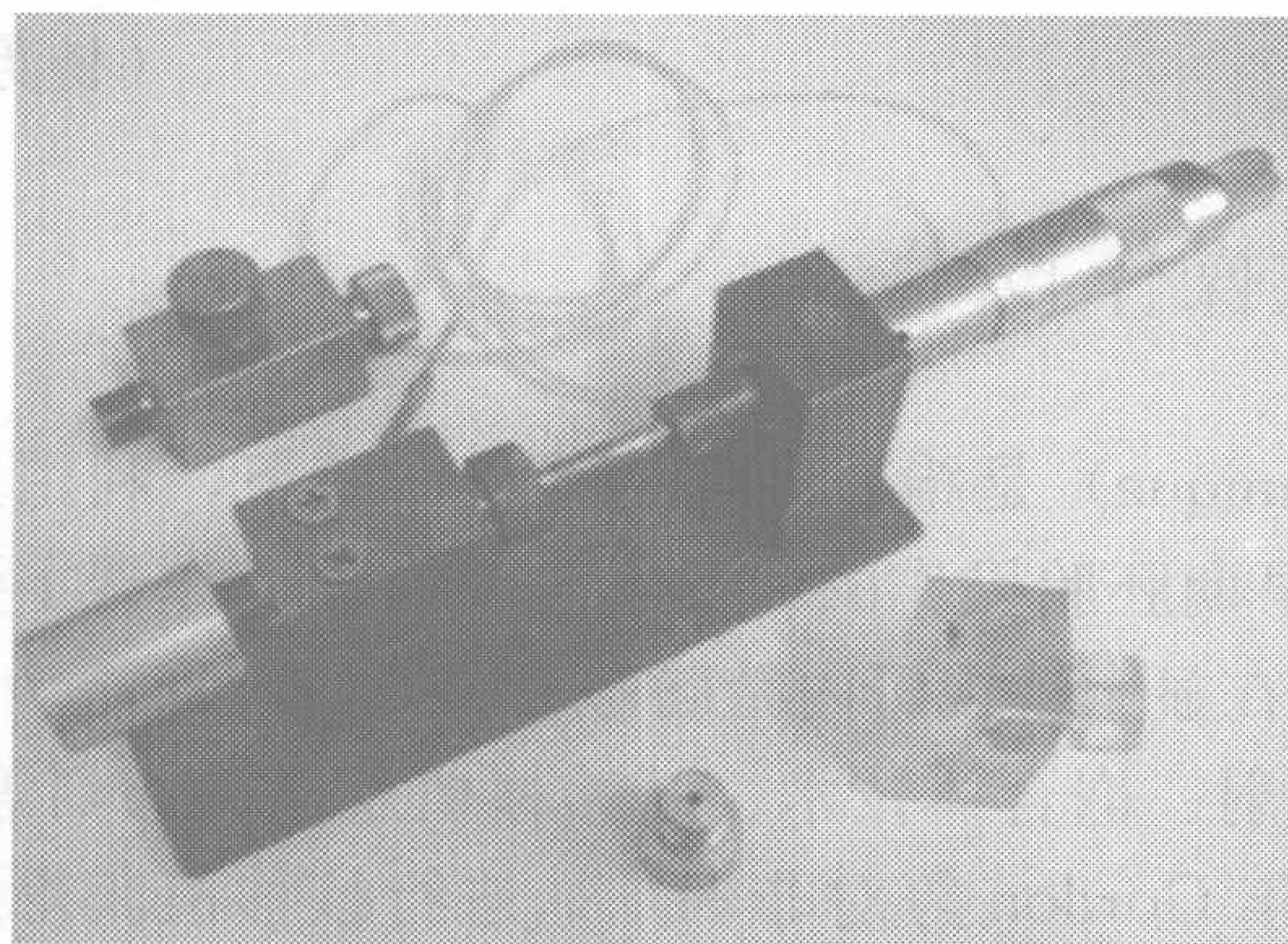


图1-13 自制的压力显微注射器

2. 材料准备

1）注射针头的拉制

（1）水平拉针仪：装上一根毛细管，拧紧左右两侧的夹子，做好固定，并使其中间部位对准加热丝，设定好电流、拉力和时间，然后按开始键，等待毛细管被拉成两个所需的微注射针头。

（2）垂直拉针仪：将玻璃毛细管固定在上面的夹子上，使其对准加热丝后旋紧，抬起下面的滑夹，固定在毛细管上，调整热度和螺线管范围。

使用拉针仪自行拉制的微注射针头，最好使用硼硅酸盐玻璃的毛细管。可以采用硅烷对注射针头进行处理，以防样品和培养基成分与玻璃的亲水表面相互作用，从而引起针尖阻塞，影响注射。

2）载玻片的处理

（1）载玻片放在陶瓷或金属架上，相互不要接触。在有自来水的烧杯中，快速浸泡和冲洗。

（2）在纸巾上把架子控干，再放入盛有 0.1mol/L HCl 的烧杯中，温育过夜。

（3）自来水冲洗盖玻片，每次 10min，共 5 次。架子浸入 70% 的乙醇中，温育 60min。

（4）离子水短暂冲洗，放在纸巾上控干。室温下自然干燥 30min。

（5）220～250℃烤 6h。

3）荧光分子探针及制备

采用的荧光分子探针为：LYCH，分子质量为 457Da；FITC-Leu-$(Arg)_2$-Ala-Ser-Vla-Ala，分子质量为 1163Da；FITC-dextran，分子质量分别为 4400Da、9400Da、19 600Da。其中 Leu-$(Arg)_2$-Ala-Ser-Vla-Ala 与 FITC 的连接参照 Simpson（1987）的方法。

4）细胞材料

紫竹梅培养于温室内，自然光照，室温 16～30℃。杨世杰等（1995）根据花蕾的大小，将花蕾阶段分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ四个时期；按花的发育进程，将花分为花蕾、开放花和衰老花三个阶段。本试验取Ⅲ期花蕾、Ⅳ期花蕾和开放花雄蕊花丝毛为材料。

5）注射材料的准备

洁净载玻片上固定一块 1.8cm×3.0cm 的透明胶带，黏面朝上，胶带的两端分别用黏面朝下的两段 1.8cm×1.0cm 的胶带固定在载玻片上。

将不同发育时期的花内带有雄蕊毛的花丝取出，去掉花药，黏附在胶带上，加一滴 Hepes 缓冲液。

取外径为 1.5mm 的玻璃管毛坯，用拉针仪拉制成尖端直径约 1μm 的注射针，用微量加样器吸取 1～2μl 稀释的分子探针，从注射针粗端加入，分子探针借助毛细管作用充满注射针的尖端，注射针的其余部分用石蜡油充满。

3. 试剂

Hepes 缓冲液：119.15g Hepes 溶解在 400ml 蒸馏水中，加 0.5 ～1mol/L 的 NaOH 水溶液调节至所需 pH（Hepes 的有效 pH 范围是 6.8～8.2），然后用蒸馏水定容至 500ml，于 4℃保存。

探针储备液用 5mmol/L 的 $KHCO_3$ 溶液配制成 1mmol/L 溶液，用 1mol/L $KHCO_3$ 调 pH 到 8.0，120g 离心 15min，置－20℃冰箱中保存。探针使用时稀释 5～10 倍，置 4℃冰箱中保存。

【方法与步骤】

显微注射操作过程

1）针头定位

（1）将装液后的针头的游离端安装在连接器上，然后旋紧连接器以固定针头，再将其固定到显微操作仪的托针管上。

（2）将载有待注射细胞的盖玻片，转移到里面有缓冲培养基的平皿中，将其放在中央。

（3）将培养皿放在显微镜载物台上，尽量将盖玻片上所画圆圈的一个对准光照的中心区，这时光的亮度最好。

(4) 用低倍物镜对准细胞调焦，将针头推入视野中心，在视野中针头呈阴影状。轻轻地落下针头，直至到达培养基中后停下。

(5) 通过显微镜观察，移动针头，必要时调整显微操作仪，直到针头的阴影在视野的上方。然后确定针头的位置，使其约处在视野中心，轻轻下调针头，直到针头变得清晰一些。

(6) 调到工作放大倍数，调准细胞焦距，找到针尖。如果找不到，重新使用低倍镜，尽量将针头调到视野的中心，重复上述步骤。

(7) 小心下调针尖，直到其完全聚焦。

2) 压力注射

将载玻片置于 Opton Microinjection System 的载物台上，将灌注好的注射针装入持针器，与自制加压装置连通。先加压，然后借助显微镜将注射针从被注射细胞的一端靠近细胞壁处小心扎入胞质，停留 30～60s，缓慢拔出注射针。

3) 荧光分子探针胞间转移的检测

在 Bio-Rad MRC-1024 激光共聚焦成像系统下，检测分子探针在雄蕊花丝毛细胞间的转移情况，使用 Laser Sharp Version 2.1T/ Time course V1.0 存储与分析图像，FOUCUS Imagecorder Plus 摄像系统摄像。

或在 Olympus BH-2 荧光显微镜下检测，B 激发，使用 Y495 阻挡滤光片。

【结果与观察】

图 1-14 为分子探针在紫竹梅雄蕊花丝毛细胞间的转移情况。

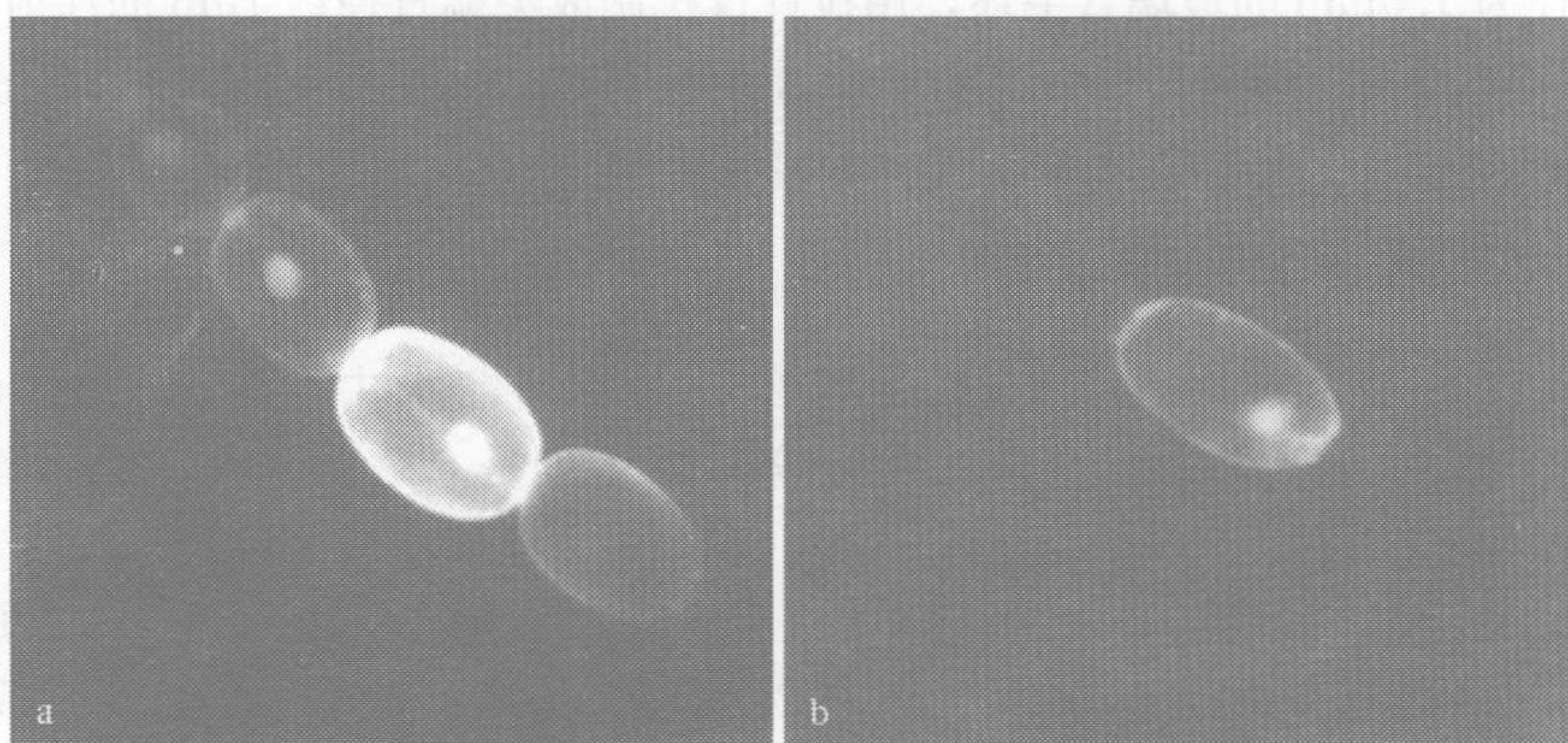


图 1-14 分子探针在紫竹梅雄蕊花丝毛细胞间的转移情况

a. 注射的分子探针为 LYCH，分子质量 457Da，注射后 2～3min 分别转移相邻的 1～2 个细胞；b. 注射的分子探针为 FITC-dextran，分子质量 9400Da，注射后 6min，只停留在注射细胞

（吴晓东）

1.5.2 受精卵显微注射技术

1980 年，Gordon 等采用受精卵原核显微注射技术，首次成功地将疱疹病毒和 SV40 的 DNA 片段导入小鼠基因组。不久，人们用同样的技术方法把重组基因稳定地引入到了小鼠的生殖系，典型的例子是美国华盛顿大学 Palmiter 等于 1982 年报道的超级小鼠（supermouse），这是转基因在小鼠体内被有效地表达并引起生理表型的第一个

成功例子。至此，受精卵显微注射技术已成为制备转基因动物最常用的方法，广泛应用于生物医药研究中。

虽然受精卵显微注射技术是目前转基因动物制备的常规方法，但它也有一些不足之处，有待进一步改进：一是整合效率低，用该法获得的转基因动物约为注射卵的10%～20%；二是不能定点整合，外源基因被注入原核后，其插入基因组是完全随机的，有时会导致转基因动物基因组的重排、易位、缺失或点突变，这就有可能影响外源基因的表达及遗传稳定性；三是方法较复杂，所需仪器设备昂贵。

【实验原理】

受精卵显微注射技术的原理简单，但过程复杂，实验的每一环节都必须准确无误，否则将导致实验失败。其基本操作程序是：将目的基因经过适当的限制性内切酶酶切、纯化并溶解在注射缓冲液中备用。显微注射时先从供体动物的输卵管内取出受精卵，利用倒置显微镜和显微操作系统将所要研究的基因注射入受精卵的雄原核，再将此受精卵植入受体动物的输卵管中，使其发育成携带有外源基因的转基因动物。

本实验以小鼠为例，介绍受精卵显微注射技术制备转基因小鼠的基本过程和方法。

【实验用品】

1. 器材

(1) 实验仪器：解剖显微镜、倒置显微镜、显微操作系统、拉针仪、煅针仪、磨针仪。

(2) 实验器材：毛细玻璃管（内径 1.0mm、1.7mm）、酒精灯、火柴、200μl 移液器、200μl 吸头、方杯、培养皿、凹玻片、酒精棉球、胚胎（受精卵）转移管、手术器盘（眼科剪、眼科镊×2、钟表镊×2、持针器、小号三角缝针、缝线、动脉夹）。

2. 试剂

三蒸水、孕马血清（PMSG 50IU/ml）、人体绒毛膜促性腺激素（hCG 50IU/ml）、TE 缓冲液（10mmol/L Tris-HCl，0.2mmol/L EDTA，pH7.5）、戊巴比妥钠溶液（10mg/ml）、M2 培养基、M16 培养基、石蜡油。

3. 实验材料

目的基因 DNA、5～8 周龄小鼠。

【方法与步骤】

1. 质粒 DNA 的准备

对于用作显微注射的质粒 DNA 的基本要求有两点：①尽量不要带有载体的序列。因为有证据表明来源于噬菌体和细菌的序列可能会干扰转基因的表达。因此，通常的做法是使用目的 DNA 片段，要尽可能切除带有载体的序列；②DNA 的纯度要高。以前大多采用超速离心方法（如蔗糖密度梯度离心）来进行纯化，此方法其过程复杂，且对于实验条件的要求也比较高。目前多采用 QIAGEN 等公司的质粒回收试剂盒抽提质粒，将目的基因质粒 DNA 经过适当的限制性内切酶酶切线性化后，在一定浓度的琼脂糖凝

胶上进行电泳，待目的条带与其他的条带分开后，回收目的基因，这样得到的DNA片段纯度可达到要求，且在琼脂糖凝胶上进行片段分离非常容易、准确。有人认为琼脂糖可能会有某些有毒物质，但只要在电泳之后对所收集的DNA片段再进行仔细地处理，这样得到的DNA片段用作显微注射仍然可以得到很高成功率。

回收后的DNA片段用显微注射缓冲液（10mmol/L Tris-HCl，0.2mmol/L EDTA，pH 7.5）稀释为1～3μg/ml浓度。按每管20μl进行分装，置－20℃保存，每次使用一管。不少实验室都发现，较高浓度的DNA并不会降低整合率。

注意：对长期保存的DNA溶液，在使用之前，还应作琼脂糖凝胶电泳检测，以了解DNA有无降解。如有DNA降解，就不应使用，尤其是片段较长（大于10kb）的DNA片段更应注意这一点。长片段DNA的转移成功率通常较高，但如果DNA有降解，很容易使转基因结构不完整。

2. 供体鼠的准备

供体鼠是提供受精卵的母鼠。一般认为，用作显微注射的受精卵最好是来自于杂交子一代（如C57BL/6J×CBA的子一代）的雌鼠与种子雄鼠（品系要求不太严格）之间的交配。这种来源的受精卵在数量、存活率及发育为成体后的生殖率等方面明显优于来源于近交雌鼠的受精卵。在大多数实验室中，习惯上是用近交系的C57BL/6J雌鼠与远缘的种子雄鼠杂交得到子一代雌鼠，再用这子一代雌鼠与其他种子雄鼠（如CBA、C3H、STL/J或129/Sv等）交配以得到受精卵。

有两种途径可以得到受精卵：一为发情期自发排卵，自发排卵的数目较少，但可耐受时间较长，不易变形；二是通过人工注射性激素诱导排卵，这一途径所得卵的数量远远超过自发排卵数，这一现象称为“超排卵”。超排卵所用的激素为孕马血清促性腺激素（PMSG），它可促进卵泡的生长和发育，并用人促绒毛膜促性腺激素（hCG）促进成熟的卵泡排卵。超排卵由每只小鼠腹腔注射5～10 IU的PMSG和hCG来诱发，先注射PMSG，48h以后，再注射hCG，并立即与雄性鼠以1∶1合笼，次晨检查阴栓，阴栓阳性者取出备用。小鼠以1～2月龄为好。较小月龄的小鼠能够得到的受精卵可能会少一些，但这种受精卵在被操作之后的发育情况一般都比较好。在超排处理之后，如果用状态较好的雄鼠（3d内没有合笼，而且在6月龄以下）进行合笼，一般有1/2～2/3的配对可以发生交配。如果可能的话，最好将每个种子雄鼠的交配情况加以记录。如果发现有的种子雄鼠连续多次（3～5次）都不交配，那么就将其淘汰。当然超排处理后所得到的卵的质量可能要低一些，如未受精、细胞形态不好或发育有异常等。

3. 受体鼠的准备

受体小鼠的生理周期应与供体小鼠同步。在供体鼠合笼的同时，选择已自然发情的母鼠与已结扎了输精管的雄鼠1∶1合笼，次晨检查阴栓阳性者即为假孕母鼠。

雄鼠输精管的结扎：腹腔注射戊巴比妥钠（10mg/ml）0.2～0.25ml，待小鼠处于完全麻醉状态，打开腹腔约1cm的开口，从阴囊把精巢和输精管压出，在输精管上相隔5mm左右间隔的两处结扎好，中间剪断；对另一侧输精管进行同样的手术，手术结

束后，按常规缝合伤口。恢复两周后，小鼠才可用于交配。

4. 显微注射针的准备

（1）移卵针：用内径 1.7mm 的毛细玻璃管，在酒精灯的火焰上拉开、煅烧成内径为 100～150μm，开口圆滑。

（2）持卵针：用内径 1mm 的毛细玻璃管，在酒精灯的火焰上拉开、煅烧成（或用煅针仪）开口内径<15μm。

（3）注射针：在拉针仪上设置好适当的参数，用内径 1mm 的毛细玻璃管制成针尖开口<1μm。

5. 受精卵的分离

基本要求是在尽可能短的时间内得到清洁的、已去除放射冠细胞的受精卵，以备显微注射用。在正式手术之前，准备工作应当充分，以保证整个过程能够不间断地进行。有几点值得注意：①卵巢暴露在空气中的时间不要过长；②受精卵在含有透明质酸酶的 M16 培养液中时间不宜过长，通常消化到放射冠细胞刚被完全去掉即可；③吸卵针的粗细要适当，内径太大不宜洗干净，太小易使受精卵受损；④M2、M16 培养液的 pH、渗透压和纯度对受精卵的质量也有影响，渗透压过高可使受精卵变形、裂解。具体方法是：

（1）在得到有阴栓小鼠的当天下午 2 时至 5 时开始工作，具体时间应选定在雄原核和雌原核最清楚的阶段。

（2）方杯、9cm 培养皿、凹玻片各一个。在方杯中加入 400μl M2 培养液（含透明质酸酶 200 IU/ml）；培养皿中分别滴 5 滴 M2 液滴（不含透明质酸酶）；凹玻片中滴一个约 80μl M2 液滴，再以石蜡油全部覆盖。培养皿及凹玻片置 CO_2 培养箱中保温待用。

（3）戊巴比妥钠（10mg/ml）0.2～0.25ml 麻醉备用的供体鼠，用 75%酒精作腹部皮毛消毒，打开腹腔，找到一侧卵巢，完整剪取卵巢、子宫间的输卵管，置于方杯中。同法取得另一侧输卵管及其他供体的输卵管。

（4）在解剖镜下，用钟表镊撕开输卵管的壶腹部，受精卵自然流出，透明质酸酶消化卵周围的卵丘细胞，使卵子裸露。

（5）在倒置显微镜下，用胚胎转移管收集方杯中的受精卵，轻轻吹入有液滴的培养皿的一个液滴中，再收集移至另一液滴，这样逐滴洗涤共 5 遍，除去透明质酸酶和组织碎片、未受精卵。

胚胎转移管通常自行制作。其制作方法是：把外径为 2mm 的毛细管（更粗一点的也可）在拉针仪上拉成注射针样结构，在其内径约为 150μm 处折断，并通过加热使其断端光滑，然后插在一带有吸头的乳胶管的一端，以备用（图 1-15）。

（6）将洗涤后的受精卵移至保温的凹玻片中，置显微操作系统上。

6. 显微注射仪的准备

（1）安置胚胎固定管：将预先制作好的用以固定受精卵的胚胎固定管安置在显微注射仪的左边。固定管的制作方法可有多种。本实验室的作法是：用外径 1mm 的毛细管

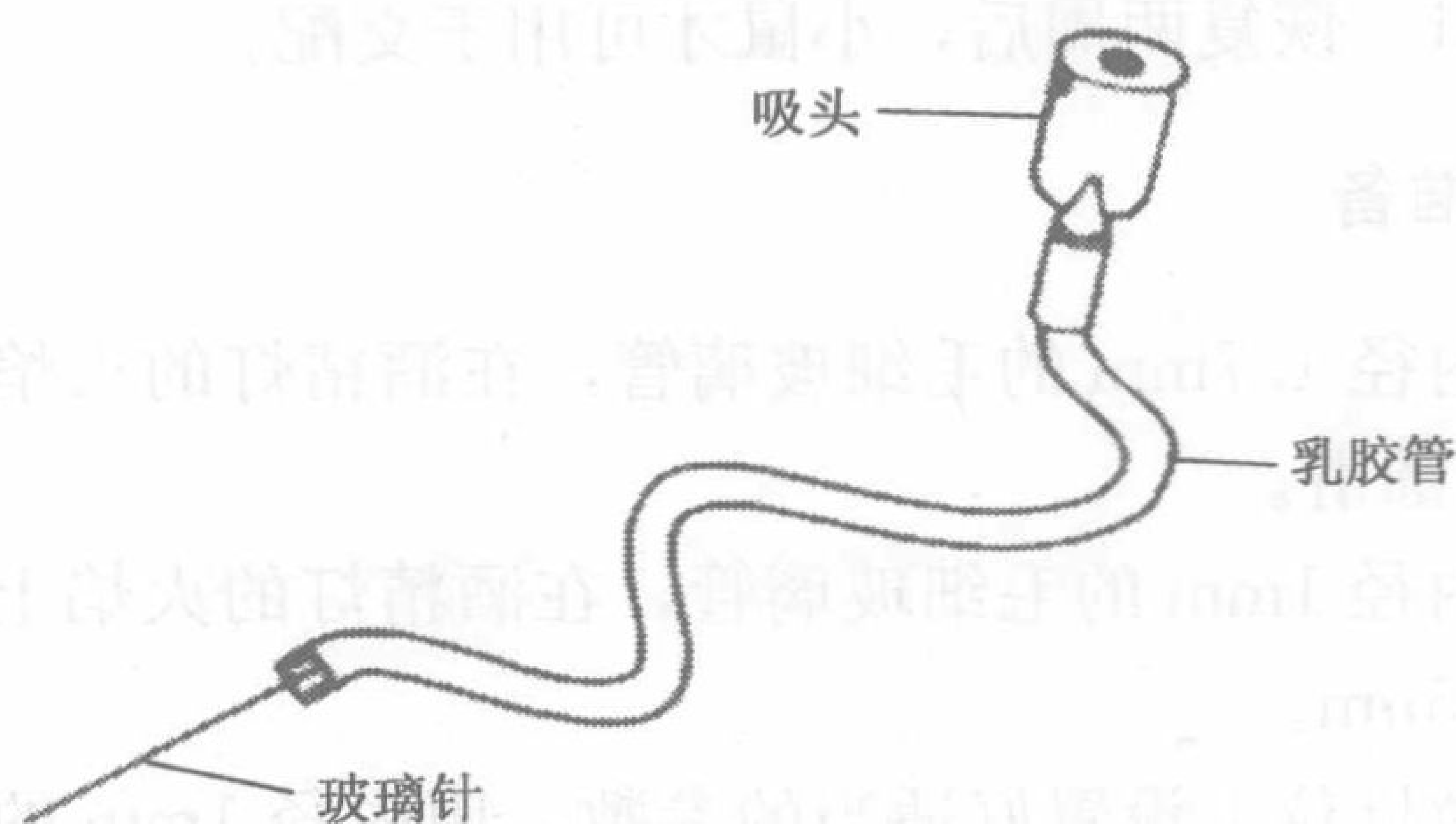


图 1-15　胚胎转移管示意图

在拉针仪上拉成注射针，再利用微针加工仪在变细部分外径约为 70～80μm 的位置上将其折断。然后在微针加工仪上将其断端熔化，使其内径缩小至约为 15μm（受精卵的直径平均为 85μm）。再在距离末端 1.5～2.0cm 处加热，使其弯曲成约 15°的角。

（2）安置显微注射针：将预制作好的注射针（带有内芯）的尾端插入注射用 DNA 溶液中，使 DNA 自动地充满注射针的顶部。通常在放置 1～2min 后，注射针的变细部分就能被充满，DNA 量也就足够了。然后将注射针安装在显微注射装置的右侧，并使注射针内处于正压状态。注射针的制作比较简单。通常是用带芯的、直径为 1mm 的毛细管在拉针仪上拉制而成，然后用微针加工仪在距离头端 1.5～2.0cm 处加热，使其弯曲成 15°。若采用无芯毛细管制作显微注射针，则 DNA 溶液的填充就需采用其他的方法。

（3）放置注射培养皿：将盛有受精卵的培养皿置于倒置显微镜的载物台上，并将 M2 液滴调至中央孔的中心处。

（4）调节焦距：首先按常规操作方法，将焦距平面与受精卵对准（此为基本焦距平面，固定管和注刻针都将统一到这一基本平面上），再将固定管的顶端调节至显微镜视野内的大致位置，并将其缓慢地下降，直至在视野中处于一个最清晰的状态。同时也尽量地使其顶端部与培养皿底部平面呈 10°，而且不接触培养皿底的表面，以便通过操纵能将固定管在焦距平面上自如地移动. 然后，将注射针的尖端调节到显微镜视野内的大致位置，再将其缓慢下降，使其尖端部分达到最清晰的程度。同时，也要使其与培养皿底部平面呈 10°，而且不接触培养皿底的表面。完成了这些步骤之后，还应进一步调整固定管和注射针的相对位置使其处于理想的状态，即当左右两个操纵柄置于正常位置时，固定管和注射针处于视野之内，并在一条直线上（至少不要有明显的角度），它们的顶端相隔 2～3 个受精卵的距离，固定管、注射针和受精卵三者都很清楚，而且固定管和注射针在视野内都能自如地移动。

7. 显微注射操作

显微注射的技术性很强：一是要保证显微注射针确实已插入原核（常为雄原核）内；二是注射的量要适当；三是要有一定的熟练程度，以尽量缩短整个注射过程的时间。其操作过程如下：

（1）置针：将持卵针固定在左边的持针器上，降入液滴，调好焦距。取一管 DNA，

注射针针尖插入DNA液中吸取DNA，将注射针固定在右边的持针器上，降入液滴，调整焦距，使持卵针、注射针及受精卵在同一平面。

(2) 选卵固定：选择细胞饱满、透明带界面清晰及原核清晰的卵，用持卵针吸住固定一个，暴露雄原核于最佳位。受精卵的最佳位置是极体在正上方，其雄原核的位置对应于固定管的中央，而且靠近右边。若不是此位置，可用固定管将其调整到此位置，然后再将其负压固定。

(3) 显微注射：将注射针快速刺入雄原核（切勿插入核仁），再适当加压，使DNA溶液注入雄原核内（其量通常以原核有所膨大为限）。随后，快速将注射针拔出，并解除固定管内的负压，使受精卵游离下来，并将其转移至视野的正下方（即时钟6点整时针的位置）。以同样方法对其他受精卵逐个进行注射，整个注射过程应在尽可能短的时间内完成。

8. 受精卵的移植

注射后的胚胎（此处指受精卵）最好尽快地移植入养母小鼠的输卵管内。以前习惯于将注射后的胚胎在CO_2培养箱中培养一段时间或者培养过夜，使其进入2-细胞阶段，以证明哪些胚胎确实是存活的，然后再作移植。但现在已意识到在体外进行这一步没有太大的必要，完全可以在注射完成之后，立即将其移植入养母体内，并尽量缩短受精卵在体外停留的时间。理由是：①不能存活的受精卵通常在注射后很快就出现形态学的异常，如受精卵膜的完整性被破坏、围卵腔消失、胞质的折光性改变和原核消失等，移植时将它们去除即可；②没有证据表明在移植的受精卵中不存活的受精卵会影响处于存活状态的受精卵的存活、发育和生长，因此，即使移植了个别不存活的受精卵对于总体结果也影响不大；③体外的环境不可能有体内的环境好。

关于植入受精卵的数量没有很严格的要求，通常是一只受体小鼠植入30余个胚胎。可以将这些胚胎集中在一侧输卵管中，也可以分为两侧，这一点可根据操作者的习惯而定。其操作过程如下。

(1) 麻醉受体母鼠：用戊巴比妥钠（10mg/ml）以7μl/g体重的剂量腹腔注射麻醉。

(2) 暴露输卵管：将已麻醉的小鼠一侧背毛剪去范围约0.5cm×1cm，侧卧于培养皿中，75%酒精消毒手术区。解剖镜下，在小鼠侧背部作一小于1cm的横切口，用眼科镊夹住脂肪垂，一并带出卵巢和输卵管，将其平放在切口外侧，动脉夹夹住脂肪垂牵拉固定。

(3) 移植：收集已注射的受精卵（15～30枚），用钟表镊撕开卵巢和输卵管的包膜，夹住输卵管的伞端，移卵针轻轻插入，吹入受精卵，回纳卵巢和输卵管，常规缝合切口。送回饲育室待19～20天后生产。

（訾晓渊）

1.6　活细胞荧光显微成像技术

活细胞荧光显微成像（living cell fluorescent imaging）技术，是利用分子生物学手段将荧光蛋白基因转染到活细胞内，通过荧光显微成像系统，观察活细胞内蛋白分子或细胞器的动态活动的技术。活细胞荧光显微成像技术是研究基因组功能活动的重要技术手段，是后基因组时代从显微水平研究活细胞内生物大分子与细胞功能关系的新技术。

【实验原理】

荧光蛋白（fluorescent protein）是在不同波长光线的激发下可发出各种颜色荧光的一类蛋白质。例如，绿色荧光蛋白（GFP）在波长484nm光线激发下发出绿色荧光，而红色荧光蛋白（mCherry）在波长587nm光线激发下可以发出红色荧光。可根据荧光蛋白的这种特性，利用分子生物学手段，制备带有荧光蛋白基因的融合蛋白基因。将这种融合蛋白基因转染到活细胞内，利用荧光相差显微镜观察细胞内蛋白分子或细胞器的动态变化，从而了解某种基因与细胞的结构及功能的关系。例如，在活体细胞内表达外源性绿色荧光蛋白（GFP）与微管蛋白（α-tubulin）的融合蛋白（GFP-α-tubulin），在荧光显微镜下可以观察到分裂期细胞内微管结构（纺锤体）的动态变化全过程。同时在细胞内表达外源性红色荧光蛋白与组蛋白（Histone H2B）的融合蛋白（mCherry-Histone H2B）可以观察到有丝分裂过程中姐妹染色体的集合和分离过程。此方法已成为当今研究细胞有丝分裂调节机制的常用方法。本试验通过将以上两种基因同时转染HeLa细胞株，在细胞内表达绿色荧光融合蛋白（GFP-α-tubulin），以及红色荧光融合蛋白（mCherry-Histone H2B），来观察细胞有丝分裂过程中纺锤体和姐妹染色体的动态变化。

【实验用品】

（1）器材：35mm^{2}玻璃底细胞培养皿（MatTek公司）、普通恒温培养箱、倒置荧光相差显微镜（带数码摄像装置）、显微镜温控装置，以及各种其他常规细胞培养设备和用品。

（2）试剂：细胞培养专用矿物油（mineral oil，Sigma公司）、脂质体2000转染试剂盒（lipofectamine 2000，Invitrogen公司）、Leibovitz's L-15培养基（CO_2非依赖性细胞培养液，GIBCO公司）、DMEM培养液、胎牛血清及青霉素、链霉素等。Leibovitz's L-15培养液成分：Leibovitz's L-15培养液90%+10%胎牛血清+双抗。

（3）材料：HeLa细胞株、真核细胞表达质粒pEGFP-tubulin及pmCherry-HistoneH2B（自制）。

【方法与步骤】

1. 细胞培养

在普通培养瓶内常规培养HeLa细胞（含10%胎牛血清DMEM培养液）。

2. 细胞传代

已长成或接近长成致密单层的 HeLa 细胞，倒出培养液，用 PBS 洗细胞后，用 0.25%的胰蛋白酶消化细胞，以 5×10^5 个细胞密度接种到 $35mm^2$ 玻璃底细胞培养皿，置 37℃ CO_2 培养箱中过夜培养。

3. 脂质体转染细胞

用脂质体 2000（lipofectamine 2000）转染真核细胞表达质粒 pEGFP-tubulin 及 pmCherry-HistoneH2B 至 HeLa 细胞内。转染过程如下。

（1）制备质粒 DNA 及脂质体 2000 与 DMEM 培养基（无血清）的混合液。

A 管：0.5μg pEGFP-Tubulin DNA ＋ 0.5μg pmCherry-HistoneH2B ＋ 200μl DMEM

B 管：1μl 脂质体 2000 ＋ 200μl DMEM

（2）分别在室温下放置 5min；

（3）混合 A 管与 B 管内溶液，室温放置 20min；

（4）取出 HeLa 细胞培养皿，将 A、B 管混合液逐滴加入培养皿内，轻轻晃动；

（5）将 HeLa 细胞培养皿放入 CO_2 培养箱中继续培养 8～10h。

4. 转染细胞观察前的准备

取出 HeLa 细胞培养皿，弃掉培养液。用 2～3ml 不含血清的非 CO_2 依赖性培养液（Leibovitz's L-15 培养液）轻轻洗细胞两次；加 2ml 含有 10%血清的非 CO_2 依赖性培养液，然后将培养皿放入湿盒中，并转移至 37℃普通恒温细胞培养箱（无 CO_2）继续培养 4～12h。

5. 转染细胞的动态观察与摄像

（1）取出 HeLa 细胞培养皿，弃掉培养液，更换 2ml 含有血清的非 CO_2 依赖性培养液；

（2）用 1ml 移液器吸取细胞培养专用矿物油，沿培养皿内壁小心加入 2～3ml，使矿物油均匀覆盖在细胞培养液表面，使培养液与空气隔离。将培养皿放至显微镜载物台上的温控培养槽（37℃预热）中；

（3）先用普通明场光源寻找细胞。发现细胞后，选择对应激发光波长的滤片组（波长分别为 484nm、587nm），打开光帘，使激发光进入光路。用 40×荧光物镜寻找有绿色荧光和红色荧光蛋白同时都表达的分裂期细胞；

（4）用相应计算机软件设置参数后，选定有丝分裂前期的细胞连续跟踪摄影。每间隔 2min 拍摄一次，连续拍摄 1h。储存摄影得到的所有图像文件。

6. 计算机图像编辑

用计算机编辑软件将所有图像按照时间顺序输出编辑成为影视文件。

【结果与观察】

在倒置荧光显微镜下可以观察到表达两种不同颜色荧光蛋白的分裂期细胞。其中，

绿色荧光蛋白显示的是微管蛋白，动态反映了有丝分裂时期的纺锤体结构的变化；红色荧光蛋白显示的是核小体，动态反映了分裂期的染色体结构的变化。

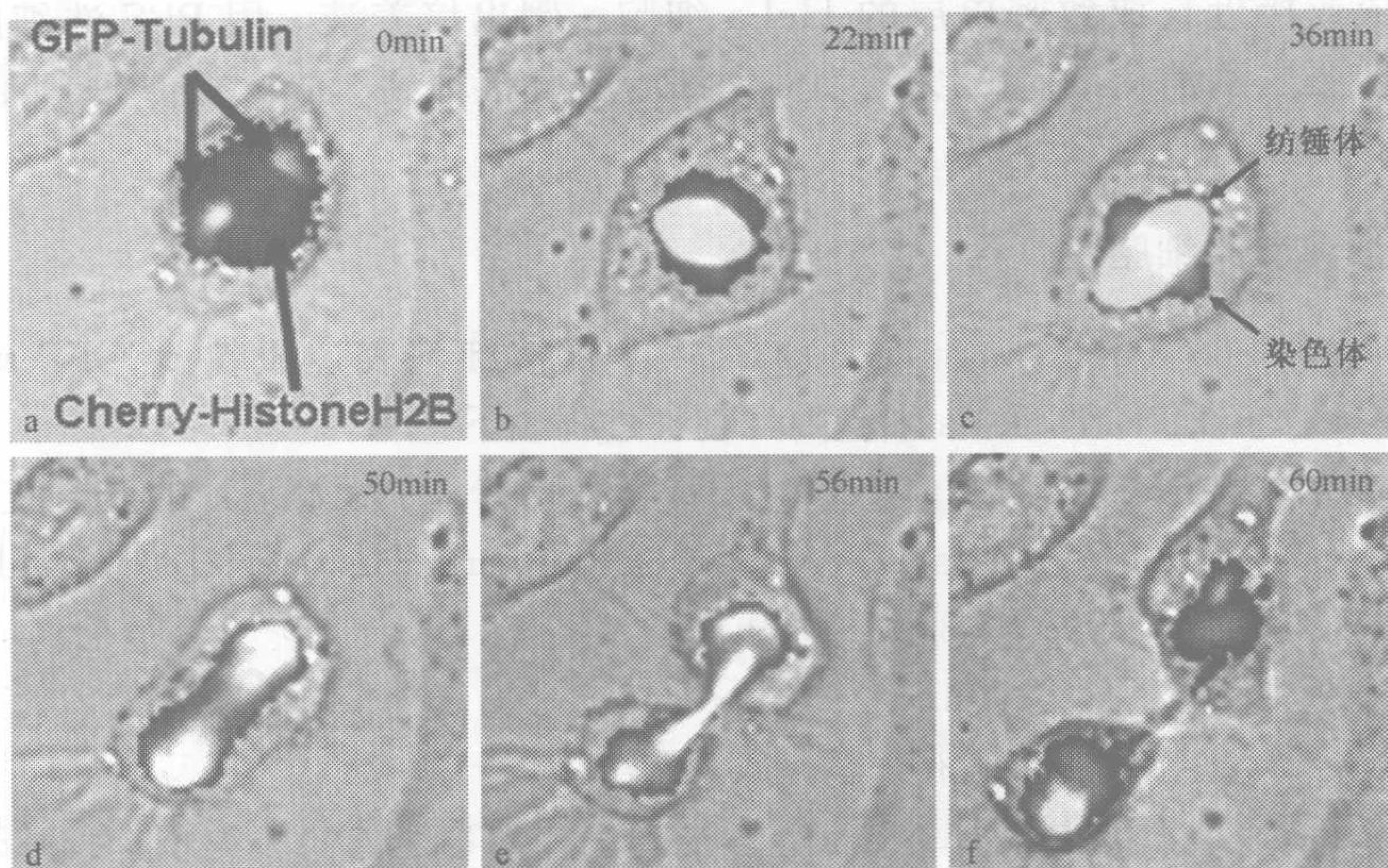


图 1-16 HeLa 细胞有丝分裂过程

a. 前期细胞，中心体开始向两边分离，染色质在细胞核内开始凝聚成染色体；b. 前中期细胞，微管蛋白排列成纺锤状结构，细胞核膜消失，染色体形成；c. 分裂中期细胞，出现典型的纺锤体，染色体聚集在细胞中央形成赤道板；d. 分裂后期细胞，两组染色体移向细胞两极，纺锤体拉长，染色体区间微管聚集成束，即中体（midzone）；e. 分裂末期细胞，染色体到达两极，纺锤体中央部位细胞膜凹陷，胞质分裂；f. 有丝分裂结束，两个子细胞形成，纺锤体消失，细胞核出现。细胞有丝分裂过程大约 1h

图 1-16 为连续摄影中选择的六张定格照片。照片中，右上角数字表示拍摄的时间；绿色显示的是细胞转染质粒表达的 GFP-α-Tubulin 融合蛋白；红色显示的是细胞转染质粒表达的 Cherry-HistoneH2B 融合蛋白。

【注意事项】

（1）严格遵守倒置荧光相差显微镜的使用规则。

（2）由于实验操作过程繁琐，为防止污染，在细胞培养液中需要加抗生素，全部过程要严格无菌操作。

（3）要选择生长旺盛的细胞观察，显微摄影一定要在 37℃恒温装置下进行。

（4）为了准确观察细胞内结构的真实变化过程，显微摄影过程中必须跟踪单个细胞，因此要将培养皿固定在载物台上，保证观察位置不变。

（5）本试验需要分别应用 484nm、587nm 两组滤光片的激发光观察、拍摄照片，然后用专门软件合成后才能在同一画面显示出绿色与红色荧光。

（朱长军）

1.7　细胞显微图像分析技术

细胞显微图像分析技术（analysis technology of microscopic cell image）是现代细胞生物学研究中的有利工具。它是伴随着现代光学显微镜技术、先进的光电转换技术、现代计算机图像处理技术等多学科的发展而诞生的，此技术一般是以细胞显微图像工作站（workstation of microscopic cell image）的形式实现的。细胞显微图像工作站是相应的硬件与软件系统的集合体，是实现细胞显微图像的显像、采集、存储、处理、分析、数据管理，以及报告生成等多种功能的工作平台。它可以完成一些技术先进、价格昂贵的细胞生物学分析仪器所能完成的工作，达到对细胞结构测量和成分精确定量分析的目的，甚至还可完成细胞三维立体图像的构建。

各种配置的细胞显微图像工作站的使用范围不同，可以简单归结为：显微图像分析、单细胞分析、面积形态和光密度分析、免疫组化分析、荧光图像分析、细胞 DNA 含量和倍体分析、淋巴细胞亚群分析、凝胶电泳图像分析、细胞凋亡分析、细胞染色体和核型分析、图文资料和图谱库管理等。

细胞显微图像分析技术已经成为现代细胞生物学技术的重要组成部分。本节主要介绍细胞显微图像工作站的主要硬件构成、工作原理及软件系统的主要功能，并简单介绍它的操作方法。

【实验原理】

细胞显微图像工作站首先由光学显微镜对样品进行光学放大，然后经过图像摄取设备将显微图像捕获，通过模—数转换（ADC）设备将连续的图像信号转换为计算机能识别和处理的数字信号，再利用显微图像处理软件对图像进行处理（如细胞图像裁切、边缘提取、锐化、平滑降噪、亮度、色彩、对比度的调整、图像分割等）；利用分析软件对显微图像进行分析（如细胞边缘自动识别、细胞形态学测量、免疫组化统计分析、细胞核质比分析、细胞分类计数、面积计算和光密度分析、荧光图像分析、DNA 含量和倍体分析以及细胞的三维立体结构重建等），最后以图文形式编辑报告结果，将图像数据进行压缩、存储、管理。

【仪器与用品】

（1）细胞显微图像工作站（主要设备包括：光学显微镜、摄像设备或其他图像输入设备、视频采集卡、高性能计算机、打印机等）。

（2）各种细胞化学、荧光细胞化学、免疫细胞化学标本片和培养细胞。

【基本结构】

1. 系统硬件组成

细胞显微图像工作站研发厂家众多，硬件配置各有特色，基本硬件组成相似。

（1）显微镜及其配件：根据用户需要而配置的正置、倒置、相差、荧光显微镜等。

（2）专业级影像感应器：如高分辨率 CCD 摄像头、彩色摄像机、数码照相机等模拟/数字摄像设备。

（3）专业级真彩色图像采集卡（为采集模拟信号配置）。

（4）显微图像采集接驳器。

（5）高档多媒体微型计算机，包括高速CD-ROM/DVD系统、高档显卡、高分辨率彩色显示器及常规外设等。

（6）高级彩色打印机：如彩色喷墨打印机、彩色激光打印机及热升华打印机等。

（7）其他可选配件：如彩色图像扫描仪、光盘刻录机、调制解调器、视频投影仪等。

2. 显微图像的输入和存储

由光学显微镜放大的细胞的显微图像本质上都是连续的波形信号，可称之为连续图像或模拟图像。要把显微图像输入计算机并被计算机分析处理，必须把连续变化的模拟信号转换为数字信号，即模-数转换。它包括对连续信号的采样、量化及编码三个步骤。所谓采样就是抽样，是利用采样脉冲序列从连续时间信号中抽取一系列离散值，将模拟信号离散化，从而转化为数字信号，图1-17是采样过程示意图。各采样点的间隔越小，采样图像的分辨率越高；反之亦然。所谓信号量化即是采样信号幅值的量化，是将每一个采样点的值经过舍入或结尾的方法用若干个整数值代表，也就是分为不同级别。最后再用一个或若干个字节来表示不同级别的采样信号，也就是将离散量变成二进制数字的过程，此即编码。表示每一采样点（像素）的字节越多，所反映的图像信息量就越大，描述图像就越准确。所以图像的分辨率、精确度等指标主要是通过采样频率和采样点的字节数这两个参数来衡量的。这样，模拟显微图像信号就被转换为计算机可以识别和处理的数字信号了。输入计算机的数字图像信号被不同方式压缩，并用各种格式以文件的形式储存在磁盘中，如BMP、JPEG、GIF、TIFF、PCX等。但为了完整保存实验图像数据，建议用BMP或TIFF格式，缺点是占有存储空间较大。

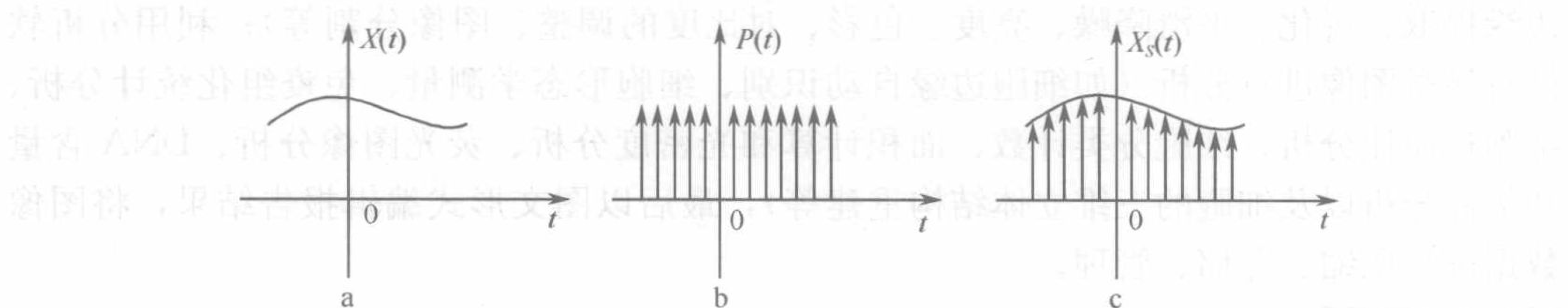


图1-17　模拟信号的采样过程

a. 连续的模拟信号；b. 采样脉冲信号；c. 模拟信号的离散化-采样结果

通常图像的数字化工作是由CCD摄像头和图像采集卡完成的。CCD（charge coupled device）即电荷耦合器件的缩写，它是一种特殊半导体器件，具有许多感光元件，每个感光元件称为像素，它可以进行光电转换，是决定摄像设备性能的关键部件，直接影响最后成像的分辨率和品质。由于荧光显微镜、暗视场显微镜放大的显微图像亮度和对比度较低，再加上普通CCD曝光时间长而产生的背景噪声，又称热噪声，所获取的图像非常微弱。利用配有冷却装置的高灵敏度科学级致冷CCD可以大大提高光感应度，降低噪声，获得清晰的图像；可以说除了显微镜因素外，CCD的档次对所获图像的质量具有决定性的作用。图像采集卡是完成模-数转换的设备，一般安装在计算机主板PCI插槽内，可将非数字摄像设备采集的信号转换为数字信号。此外，也可以直接通过

数字摄像机或高级数码照相机完成图像（包括动态图像）的捕捉和数字化，此类摄像设备所记录的信号即是数字信号，可由特殊端口直接由计算机读取。另外，图像扫描仪、图像文件调入等方式也可完成显微图像的输入。

3. 自动控制装置

细胞显微图像工作站可选配全自动型光学显微镜，可利用软件系统控制载物台各方向的移动、物镜的转换和控制马达带动调焦旋钮自动调整焦平面，在无人操作的情况下全自动地进行图像分析。有的还可以通过软件系统控制荧光显微镜滤色片模块的位置转换及荧光照射快门的开合等。另外有些设备还可以用软件来控制显微操作平台进行显微切割，如将所选取的单个细胞完整切割出来进行处理。总之细胞显微图像工作站的自动控制功能和性能由所选配的设备和软件系统决定。图 1-18 所示是细胞显微图像工作站的硬件组成。

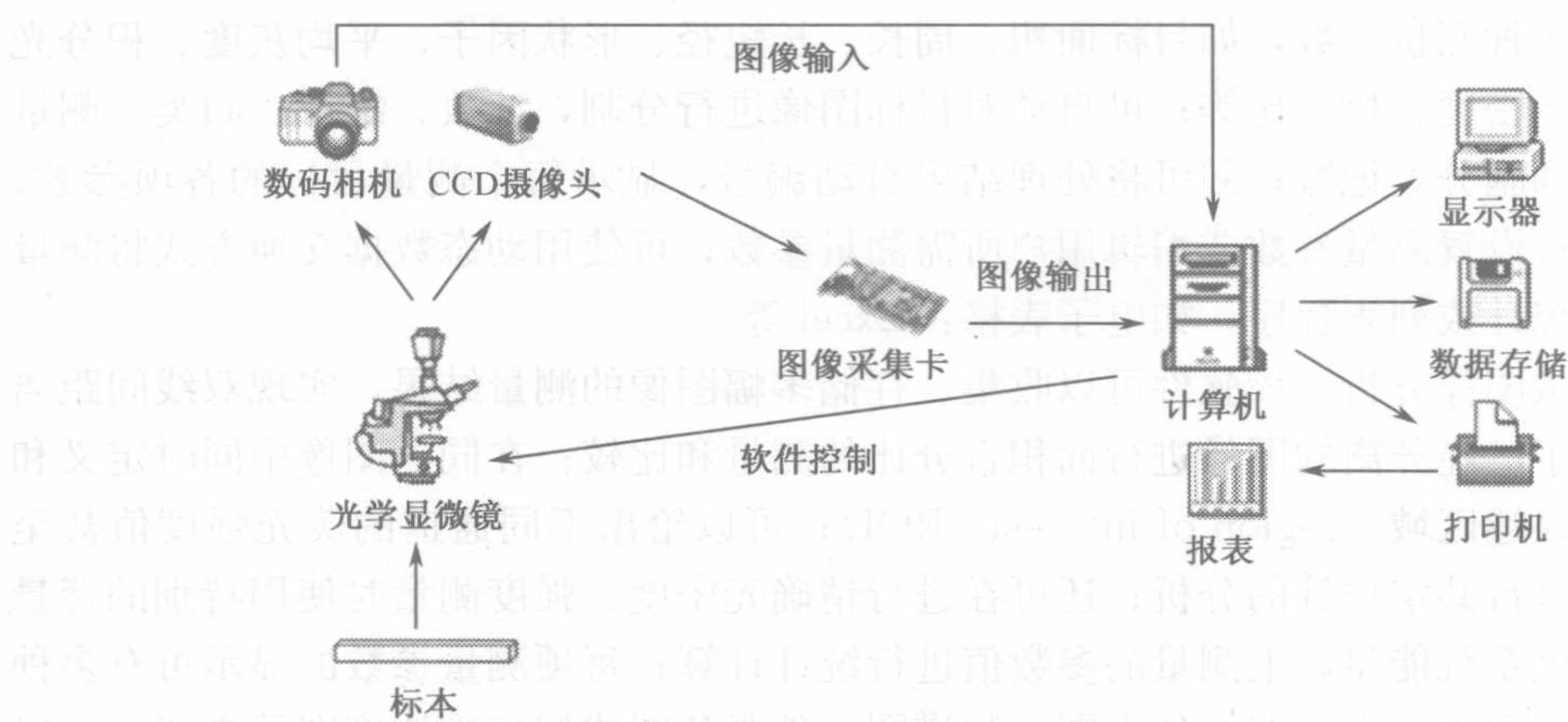


图 1-18　细胞显微图像工作站的硬件组成

4. 细胞显微图像分析软件

各个公司开发的细胞显微图像分析软件具有不同的操作界面和使用方法，但功能基本相似，其中比较优秀的专业图像分析软件包括美国 Universal Imaging 公司的 MetaMorph 与 Media Cybernetics 公司的 Image-Pro Plus。下面简单介绍一下该类软件的基本功能。

（1）自动控制功能：该软件系统支持 Windows 操作系统，可以直接用软件驱动控制显微镜自动电动平台在 X、Y 或 Z 轴方向的移动，包括滤镜转盘、快门、镜台及电动显微镜等电动装置；所拍摄的 Z 轴图像，可存储为单张图像或序列图像，通过显微镜（明场或荧光显微镜）进行平台扫描拍摄，运用自动对焦数学运算法则，能自动生成清晰的 Z 轴图像；通过控制显微镜电动平台沿 Z 轴移动，用延长景深的方法合成 Z 轴共焦平面图像；可进行 X、Y 和 Z 轴方向距离的测量并保存图像的 X、Y、Z 轴信息；通过记录信息，能自动完成重复移动操作；通过拍摄叠加 X、Y 轴上的画面与图像无缝连接使扫描样本成为一张高分辨率的图像等，这也称为景深扩展。

（2）显微图像采集：该软件可支持包括数码相机、图像采集卡、TWAIN 和扫描仪等输入设备进行图像采集；支持各种图像文件格式，包括 8 位、12 位、16 位灰度图像

和24位、36位、48位彩色图像等，还支持共聚焦显微镜图像。

（3）显微图像处理功能：经摄像设备与模-数转换而来的图像并不一定非常理想，通过软件可对待测图像进行一系列校正和处理，以期得到较高质量的图像和精确的测量结果。它可对待分析图像进行均匀化、视场平衡、背景校正、滤色处理、颜色分离、图像叠加，以及运用色彩、亮度、对比度等多种等效对比增强技术（equalization）加强图像的色彩质量或对比度；还可进行如快速傅里叶变换（FFT）等数字形态学处理和算术运算，高速完成复杂的图像处理工作；还能通过软件滤波器组根据需要对待测图像进行锐化、柔化、羽化、强化物体边缘等处理；对相互重叠或成簇的物体，形态学操作将能进行有效分离，以便完成形态测量处理；另外还包括色彩通道和混色、交互式彩色信息分离、同位性分析等功能。

（4）显微图像测量：可提供点、线、面积和角度四大类形态学测量和浓度测量功能，能提供多种测量参数，如目标面积、周长、长短径、形状因子、平均灰度、积分光密度、绝对光密度、核浆比等；可自动对目标图像进行分割，计数、统计、归类、测量等操作，如细胞分类记数；并可将处理结果自动编号，显示每个测量目标的各项参数；另外还可自行设置测量参数或编辑用户所需测量参数；可使用动态数据交换方式将测量结果输出至统计或列表程序，如电子表格：Excel等。

（5）显微图像分析：该软件可以收集、存储多幅图像的测量结果，实现双线间距离的测量；对于已经分离的图像进行面积百分比的测量和比较；在同一图像中同时定义和管理多个感兴趣区域（region of interest，ROI）；可以给出不同通道的荧光强度值甚至三维强度图进行共定位等的分析；还可在进行精确光密度、强度测量时使用特别的背景校准图像；该系统能将以上测量的参数值进行统计计算；每项测量参数的显示可有多种形式，如数据列表、直方图、位点图、频谱图、伪彩色图或假三维浓度图等方式，可以形象地反映测量结果以及能在图像上添加注解和标注，修改色彩。

该类软件的另一个特点是可以实现细胞结构的三维重建（3D construction），即利用三维处理模块将采集于电动或共聚焦显微镜的序列光切图像中所隐藏或难于理解的信息提取和表达出来，体现模拟的细胞三维图像。

（6）图像数据的管理和输出：经过分析的显微图像或原始图像被以数据库的形式管理起来，实现对图像的批处理和有序地存储和调用数据。所需的图像和测量分析结果以报告的形式通过打印机输出，还支持网络传输功能，实现网上在线讨论和数据分享。总之，显微图像分析系统硬件的不同配置和相应软件的开发可以不断扩展它的功能，许多图像分析、处理功能还有待开发。

【显微细胞图像工作站的使用方法】

所谓“七分在制片，三分在拍照”，要得到一张效果理想的细胞显微图像及分析数据，除了前期正确的制片过程外，后期的图像拍摄、处理与分析至关重要。

显微细胞图像工作站硬件的使用非常简单，只要各部分设备已连接并测试好，按照正常使用显微镜和计算机的方法操作即可。这里重点介绍软件的使用方法，其中包括图像采集软件、处理、测量和分析软件。

图像采集软件的使用一般操作比较简单，大都包括图像预览、曝光时间调整、焦距位移指示、标尺设定等功能。有些还带有简单的图像处理功能，如色阶调整、色彩平

衡、黑/ 白平衡等，可以对正在拍摄的活图进行即时调整，以期得到满意的图像质量。如有时由于曝光或光照问题，拍摄的明场图像背景偏黄，可以用白平衡将其背景调整为柔和的白色，使图像对比鲜明。在拍摄荧光图像时，如预览图像对比不明显，背景中非特异性荧光干扰，可以通过缩短曝光时间及运用色阶调整工具等方法使背景变暗，突出阳性结果。

大多数的显微图像处理、测量和分析软件都支持 Microsoft 公司的 Windows 操作系统，它们的工作界面多为标准 Windows 应用程序界面，各种图标也多为标准型。该种软件都设有很多工具栏按钮对应着相应菜单栏的常用命令，如打开、关闭、文件调入、绘图等操作，只要会使用 Adobe Photoshop、Word 等应用软件，就能很快掌握它的使用方法。

具体细胞图像处理和分析软件的使用方法，因软件的不同而异，它们菜单项的设置、图像处理命令的顺序安排和命名都有所不同。首先，它们大多都有完成自动控制功能的命令；可以控制摄像分辨率的级别，有控制图像预览和决定图像选取和采集的命令，如图像冻结、图像格式选择和打开已经拍摄的图像文件，还可以将图像文件进行不同存储格式的转换。

实际实验过程所获得的显微图像不一定令人十分满意，比如图像背景中非特异性干扰，前景与背景对比度低，图像色彩存在偏差，图像大小、位置、角度等需要调整等，都可以利用相应处理功能进行调整。例如，通过移动滑块或数值输入等方式调整图像的明暗度、对比度、色阶和色彩平衡等参数尽量将前景结果与其背景的对比拉大，又使图像不失真，保持适度的亮度而不溢出，色彩真实而对比鲜明。具体应用时各功能的协调控制是关键。对于同一样品从不同通道获取的各图像，还可通过软件叠加，合成为同一张图，从而进行定位与共定位的分析；反之也可将合成图拆分为不同通道的图像。因各种原因可导致对同一对象所获图像的错位，这时可通过软件进行旋转、对齐。细胞显微图像处理虽然不是艺术加工，在尊重事实的基础上，采用各种滤镜功能进行适当处理，可以达到突出结果，说明问题的目的。例如，应用“锐化”功能对边界模糊的细胞图像进行处理就可细胞边缘使变得清晰，减弱了由硬件原因所致对图像质量的影响。用“斑点去除”工具能自动删除背景中过多的杂质。

下一步处理就是选取图像分析区域，类似于 Adobe Photoshop 的操作方式，用鼠标选择图形形状并拖动划定范围或自由选择范围，后面的图像分析就只对这个划定范围进行。图像处理时还可利用相应命令进行图像的色彩分割，即设定好一定条件或上下限阈值，软件可自动对所选图像区域中的各个分析对象（如不同细胞）用不同颜色涂色和自动分割，如对某些涂色区域不满意，也可对个别对象手动涂色或删除；还可将连接在一起的各个对象自动或手动分成单个；另外可进行图像的边缘平滑、锐化、图像标注等操作，这些工作将为下一步的测量和分析做好准备。

在图像测量和分析功能中，可直接利用相关命令配合鼠标完成诸如角度、长度（周长、轴长）、核质面积比例、圆度、光密度等参数的测量并给出表格、直方图或 3D 分布图等输出结果。选取相关参数还能得到平均值、标准差等统计结果。有的软件还可利用所测参数重建细胞的三维图像或绘制假三维浓度图描述某一参量。

最后利用软件的报告编辑和打印功能完成报告的输出。

【注意事项】

细胞显微图像分析系统在细胞生物学尖端研究工作中发挥着重要的作用。由于它具有灵活的可操作性，需要研究人员具有实事求是和严谨的科学态度，才能够保证分析结果的有效和真实。

（赵玲）

参考文献

辛华. 2004. 细胞生物学实验. 北京：科学出版社

杨世杰，李明义，张孝英. 1995. 紫竹梅雄蕊毛发育过程中胞间连丝通透能力的动态变化. 植物生理学报. 21：355～362

Gordon J W，Scangos G A，Plotkin D J et al. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc Natl Acad Sci USA，77：7380

Hogan B，Costantini F，Lacy E. 1986. Manipulating the Mouse Embryo：A Laboratory Manual. USA.

Khodjakov A，Rieder C L 2006. Imaging the division process in living tissue culture cells. Methods，38(1)：2～16

Palmiter R D，Brinster R L，Hammer R E et al. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein growth hormone fusion genes. Nature，300：611

Palmiter R D，Chen H Y，Brinster R L. 1982. Differential regulation of metallothionein thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. Cell，29：701

Rusan N M，Fagerstrom C J，Yvon A M et al 2001. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. Mol Biol Cell，12(4)：971～980

Shaner N C，Campbell RE，Steinbach P A et al. 2004. Improved monomeric red，orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. Nat Biotechnol，22(12)：1567～1572

Simpson I. 1978. Labeling of small molecules with fluorescein. Analy. Biochem.，89：304～305

Zhu C，Lau E，Schwarzenbacher R et al. 2006. Spatiotemporal control of spindle midzone formation by PRC1 in human cells. Proc Natl Acad Sci USA，103(16)：6196～6201

第2章 电镜技术

电镜技术（electron microscopy）推动了细胞生物学的迅速发展，在细胞精细结构研究方面发挥了重要作用。

电子显微镜（electron microscope，EM）是以电子波作为光源、电磁场作透镜、利用电子散射过程产生的信号进行显微成像的大型仪器设备。根据电子波照射样品方式、电子散射（electron scattering）信号、加速电压及分辨能力等，可以把电镜分为许多种类型。针对不同类型的电镜又有与之相应的数十种生物样品制备方法。常规透射电镜（transmission electron microscope，TEM）和扫描电镜（scanning electron microscope，SEM）技术是细胞生物学常用的基本方法，本章主要介绍 TEM 与 SEM，同时介绍两大类电镜的生物样品制备技术，如超薄切片技术、负染色技术、电镜细胞化学技术等。

2.1 透射电镜

透射电镜是发展最早、应用最广泛的电子显微镜。在医学上，适用于观察研究组织、细胞内部的亚显微结构、蛋白质、核酸等生物大分子的形态结构及病毒的形态结构。配合样品制备技术或使用分析电镜（analytical electron microscope，AEM）技术，可在超微结构水平上，对组织细胞的化学成分进行定性定量的综合分析。TEM 的分辨本领（resolving power）[①] 为 0.1～0.3nm，放大倍数为 50×～500 000×，加速电压（acceleration voltage）为 20～200kV。

【实验原理】

普通 TEM 由电子光学系统（简称镜筒）、供电系统和真空系统三部分组成。镜筒是 TEM 的核心，供电系统和真空系统是根据镜筒设计的。

TEM 的镜筒是由电子枪、6～8 级电磁透镜（electron magnetic lenses）及一些光路元件组成的密闭圆筒。电子枪发射电子波，被称为“光源”，而电磁透镜则是由电流流过线圈产生的一个个磁场。当电子束穿过这些磁场时，磁场对运动电子的作用类似玻璃透镜对可见光的作用。根据每个磁场的功能并沿用光镜的称谓习惯，自上而下依次称为：聚光镜（2～3 级）、物镜、中间镜（2～3 级）和投影镜。样品置于聚光镜和物镜之间，观察室和照相室在投影镜下方。以样品室为界，之上统称为照明系统，之下统称为成像系统。TEM 的聚光镜把电子束聚焦并照射在样品上，带有样品结构信息的透射电子（transmission electron，TE）进入成像系统，被各级成像透镜聚焦、放大后，投射在观察荧光屏上，形成透射电子显微图像。如果把荧光屏移开，便可以用电子感光板拍照，或用联机数字成像系统记录（图 2-1）。

---

① 分辨本领（resolving power）是衡量一个光学系统性能的重要技术指标，它用该光学系统能分辨清的两点间的最小距离来表示。分辨率（resolution）严格讲，是用来表达图像清晰程度的。具有很高分辨本领的光学系统，在不同的成像条件下所获得的图像分辨率是不同的。

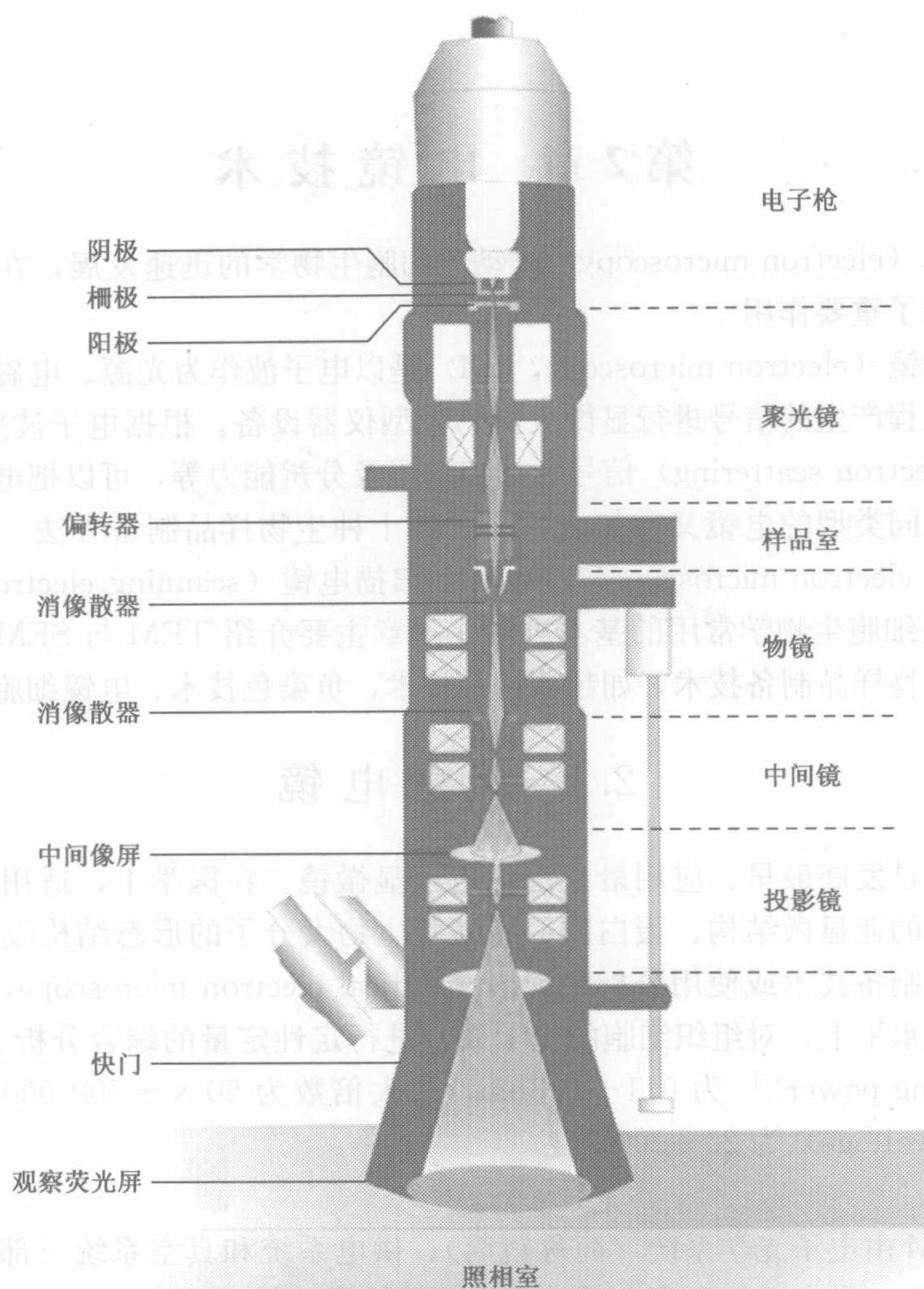


图 2-1　TEM电子光学系统示意图（李伯勤提供）

电子枪发射出的电子在 60～100kV 的加速场中获得速度和能量，以透射过厚度为 50～70nm 的生物样品。聚光镜聚焦电子束并泛光式地照射在样品上。在样品室，高能量的电子束与样品作用发生电子散射。样品下方的反差光阑（contrast aperture），拦截（吸收）强散射电子，而使直接透射电子及部分弱散射电子通过。这样，通过光阑进入成像系统的透射电子就带有样品的精细结构信息。相对“质量—厚度”（ρt）① 高的结构区域，电子散射强，进入成像系统的透射电子少，反之，则多。这些透射电子经过物镜和中间镜的放大，由投影镜投射到观察荧光屏上，激发荧光屏发出可见光。透射电子多，屏亮，称“低电子密度”；透射电子少，屏暗，称“高电子密度”。屏上“电子密

① “质量—厚度”是描述样品性质的物理量，在 TEM 中，等于一微细结构点的密度 ρ(μg/cm^3) 乘以入射电子束通过该点的距离 t(cm)，常记为“ρt”，单位是 μg/cm^2。

度”的高低对应着样品精细结构的“质量—厚度”（ρt）高低。这样，生物样品的透射电子显微图像就形成了，其图像分辨率（resolution）比TEM的分辨本领（resolving power）差1个数量级（图2-2）。

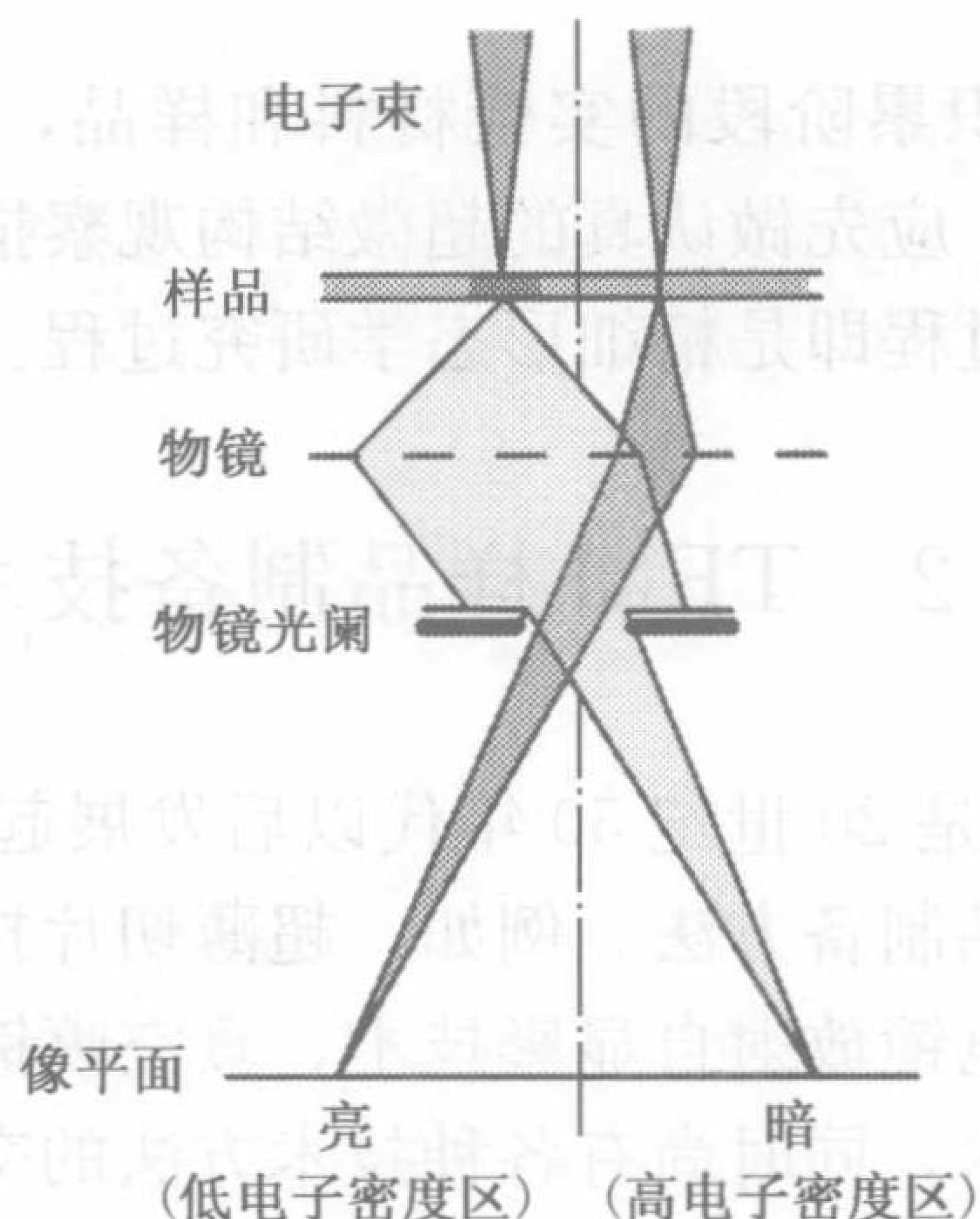


图2-2 TEM散射吸收反差成像原理示意图（李伯勤提供）

【实验用品】

（1）仪器：透射电子显微镜。

（2）用品：合适的TEM生物样品及载网、TEM样品载网专用镊子、专用样品盒。

【方法与步骤】

透射电镜的基本操作程序：

（1）打开电源，待镜筒真空达到最佳状态后（一般优于10^{-6}torr①）开始工作。

（2）根据样品情况，选择合适的加速电压，使阴极加热并达到饱和。

（3）核对照明系统对中状态，选择合适的电子束斑。必要时进行照明系统合轴操作。

（4）放入样品，核对成像系统的对中状态，必要时进行成像系统合轴操作。

（5）根据样品情况，选择合适的物镜光阑并使之对中。

（6）低倍率（200倍左右）观察整个载网上的超薄切片分布情况。

（7）中倍率低档（3000倍左右）确认要观察样品的位置。

（8）把感兴趣的区域调到屏中心，选择放大倍数进行放大（常用3000～60 000倍），观察分析超微结构特点和规律。

（9）移动有代表性、有价值的结构到荧光屏中心，确认拍照区域、物镜聚焦、光斑散焦至合适亮度并使之居中，操作拍照记录系统。

（10）关机操作。

计算机的应用简化了TEM的操作步骤，按照规程操作，容易掌握。但系统的超微结构观察分析知识必须通过长期而认真的电镜工作积累，逐渐形成从目力、显微到亚显微的形态学知识链，锻炼既能通观全局、又能深入细致的观察和分析的能力。

① 1torr＝1.333 22×10^{2}Pa。

当使用透射电镜观察生物样品时，既要看到TEM高分辨能力和优良的样品制备技术所达到的精细结构效果，又要充分了解其取材之“微”（超薄切片的面积一般为300μm×300μm）和视野之“大”（有效放大倍数高）所带来的局限性，注意联系光镜观察及其他实验结果。

对于一些未知的、资料积累阶段的实验材料和样品，如果TEM观察尚未达成共识，切忌简单写出研究结论，应先做认真的超微结构观察描述，然后结合其他实验进行分析，在这种情况下，观察过程即是精细形态学研究过程。

2.2　TEM样品制备技术

TEM生物样品制备技术是20世纪50年代以后发展起来的，针对不同的观察目的和材料，有几十种不同的样品制备方法。例如，超薄切片技术、负染色技术、电镜细胞化学技术、免疫电镜技术、电镜放射自显影技术、真空喷镀技术、核酸电镜技术、冷冻蚀刻技术及其他冷冻制样技术，同时尚有各种技术方法的交叉结合等。

2.2.1　TEM超薄切片技术

【实验原理】

超薄切片是TEM样品制备最基本最常用的技术，其制备过程与石蜡切片有许多相似之处，即包括：取材、固定、脱水、包埋、切片、染色等基本步骤。所不同的是，使用的试剂不同，对样品制备过程中各种条件的要求更严格、更精细。

【实验用品】

1. 试剂

0.2mol/L PB、2.5%戊二醛、1%四氧化锇（O_sO_4）、50%乙醇、60%乙醇、70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、无水乙醇、90%丙酮、无水丙酮、环氧树脂Epon812、DDSA、MNA、DMP-30、三氯甲烷、Formvar、乙酸铀染液、枸橼酸铅染液、固体氢氧化钠。

2. 试剂配制

（1）0.2mol/L PB

A液：磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$）35.61g，加双蒸水溶解至1000ml。

B液：磷酸二氢钠（$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$）31.21g，加双蒸水溶解至1000ml。

根据不同要求，按不同配比，可得不同pH的0.2mol/L的PB（表2-1）。

表2-1　不同pH的0.2mol/L的PB配比

pH（25℃）	7.0	7.2	7.4	7.6
A液/ml	30.5	36.0	40.5	43.5
B液/ml	19.5	14.0	9.5	6.5

(2) 2.5%戊二醛（$C_5H_8O_2$）固定液

25%戊二醛 10ml，0.2mol/L PB 50ml，加双蒸水 40ml。

(3) 1%四氧化锇（锇酸）固定液

① 2%锇酸储存液：取 0.5g 锇酸安瓿瓶，先用肥皂水清洗，泡酸 48h，用自来水冲洗 24h，双蒸水漂洗 30min。干后用玻璃刀划 1～2 道痕，置入棕色磨口瓶，加双蒸水 25ml，用力摇动使安瓿破碎。静置 48h 待锇酸溶解备用（使用时再加入 0.2mol/L 的磷酸缓冲液 25ml 稀释即可）。4℃避光保存（用黑纸袋或黑色塑料袋包裹）。

② 1%使用液：取 2%锇酸储存液 10ml，加 0.2mol/L PB 10ml 混合。

(4) 不同浓度的乙醇溶液：用双蒸水把无水乙醇稀释成 90%、80%、70%、60%、50%的乙醇。

(5) 90%丙酮：用双蒸水稀释无水丙酮。

(6) 环氧树脂 Epon812 包埋剂（Luft 配方）（A 液和 B 液分别配制，搅拌均匀）：

A 液：	Epon812	612ml
	DDSA	10ml
B 液：	Epon812	10ml
	MNA	8.9ml

使用时根据不同硬度要求按一定比例（1∶1～1∶9）混合，使用时可根据季节、气候不同，调节 A、B 液的比例，以调节包埋块的软硬度。冬季或气候干燥时，A 液比例高一些，夏季或阴雨天时，B 液比例高一些。常用比例为 1∶1。AB 液混匀后，逐滴滴入 DMP-30（加速剂），边滴边搅，充分搅拌 30min 左右，浓度控制在 1%～2%。

(7) 0.5%的甲苯胺蓝：甲苯胺蓝 0.5g，加入 pH7.4 PB 100ml，充分溶解后用滤纸过滤即可使用。

(8) 0.2%的 Formvar 溶液：取 Formvar 0.2g 放入棕色磨口瓶中，加入三氯甲烷 100ml，静置于室温下溶解后即可使用。

(9) 乙酸铀染液：乙酸铀 $UO_2(C_2H_3O_2)_2 \cdot 2H_2O$（uranium acetate）溶于50%～70%乙醇中至饱和，静置 1～2 天，未溶部分沉淀在瓶底，取上部黄色透明溶液使用，避光保存。

(10) 枸橼酸铅溶液：

A 液：	硝酸铅 $Pb(NO_3)_2$	1.33g
	枸橼酸钠 $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	1.76g

双蒸水（加沸、冷却）30ml，充分摇匀，混悬液为乳白色枸橼酸铅铬合物。

B 液：	氢氧化钠 NaOH	1mol/L

使用液：A 液配制完毕 30min 后，加 B 液 8ml，加双蒸水至 50ml 混匀，溶液清亮（pH12）。如有沉淀，可离心后再用。最多保存半年（室温）。

【方法与步骤】

1. 取材

将动物处死后，要快速取出组织，以免细胞内部细微结构发生改变。取材过程要注意以下几点：取材部位要准确；无人工损伤，不要牵拉、挤压；样品块要小，一般切成

$1mm^3$的小块，起码在某一个方向上的厚度要≤1mm；组织离开活体后尽快（1min之内）进入预冷的戊二醛固定液中（4℃）保存。

1）一般动物组织的取材

（1）将动物麻醉或急性处死，解剖取出所需的器官。

（2）用锋利的剪刀剪取一小块组织，先用预冷的0.1mol/L的PB冲洗掉血污，然后放在洁净的蜡板上，滴几滴预冷的戊二醛固定液。

（3）把双面刀片折成两半，双手各执一半呈剪刀状，将组织切成截面为1mm×1mm的长条，再将长条切成$1mm^3$左右的小块。

（4）用牙签将样品放入盛有冷的戊二醛固定液的小瓶中，贴上标签，写明样品编号。

说明：针对观察要求高的样品，必须进行原位固定或灌流固定，待组织适度硬化后再取材。对需要做定向包埋的样品如皮肤、血管、黏膜等，取材时应考虑到切片的方向性，将组织切成截面为1mm×1mm、长度为2～3mm的长条即可。

2）贴壁培养细胞的取材

（1）在培养瓶中加入适量的戊二醛固定液，在冰浴条件下固定3～5min。

（2）用细胞刮轻轻刮下贴壁细胞，将含有细胞的液体转移到离心管中低速离心分离（1000r/min左右）10～15min，使细胞聚集成团。

（3）弃去上清液，加入新的戊二醛固定液离心，视细胞大小选择合适的离心速率分离10～15min，使细胞聚集成更结实的团块，置4℃冰箱中保存。

说明：用这种方法取材的前提是培养细胞有足够的数量（一般10^5～10^7个/ml），第二次离心时使细胞团块结实一些，避免在以后的多次换液操作中丢失细胞。实验中经常遇到的问题是，用戊二醛初固定后再离心的方法往往不易使细胞聚集成团，而采用直接离心含细胞的培养液，弃上清后加入戊二醛固定液再离心的方法，但这样容易造成细胞超微结构保存不良。

其他培养细胞的TEM样品制备可参考上述方法。

2. 固定

电镜样品的固定一般采用双重固定法，即先用戊二醛前固定，再用四氧化锇后固定。两次固定之间要进行充分漂洗。

（1）前固定：新鲜样品立即投入预冷的2.5%戊二醛中，4℃条件下固定3h。若不马上进行后面的制备程序，可继续置于2.5%戊二醛固定液中（4℃），或保存在新配置的0.2mol/L PB中（4℃）。

说明：戊二醛（glutaraldehyde，$C_5H_8O_2$），相对分子质量为100.12，是一种五碳双醛，市售浓度多为25%水溶液，无色透明，pH 4.0～5.0。氧气、高温、中性或碱性均可使其失去醛基，应低温、密封保存。两个醛基与蛋白质、核酸等的氨基发生交联作用，可以较好地固定蛋白质、核酸和多糖，能保存微管、糖原、核蛋白和细胞基质，不易使酶失活，可用于细胞化学研究。但戊二醛不能固定脂类，对脂质颗粒、膜结构等保存不好。如果对超微结构（尤其膜系统）有较高观察要求，样品不宜在戊二醛中保存过长，一周内进入常规制备程序为好。2.5%的戊二醛固定液对组织的平均渗透深度为

0.5mmol/L，这是取材要求小的原因之一。

（2）四氧化锇后固定：进行后固定以前，材料要用0.1mol/L PB漂洗三次，每次10min。避免戊二醛与OsO_4发生氧化还原反应，生成沉淀。彻底漂洗后取出，转入1% OsO_4固定液中，4℃条件下固定1～2h。

说明：四氧化锇（OsO_4）相对分子质量为254.2，呈淡黄色结晶。其水溶液呈中性。对氮有较强的亲和力，能与蛋白质氨基迅速结合形成交联化合物，能与不饱和脂肪酸反应，生成四氧化锇二酯化合物，使含有脂类的结构固定。锇是一种高原子序数元素，在用OsO_4固定样品的同时，还起到一种电子染色作用。但是OsO_4不能固定核酸，对糖原、微管等保存不好。同时，OsO_4又是酶的钝化剂，不能用于细胞化学研究。OsO_4固定时间太长，不仅易丢失成分，而且会使组织变脆，难切片。OsO_4具有极强的挥发性和毒性，在任何污染和光照条件下，都可能还原成水和二氧化物而减弱固定效果，故不易长期保存，呈棕色或黑色时，均认为失效。1%锇酸固定液对组织的渗透深度比戊二醛差，有实验证明仅在0.25～0.5mm深度内能迅速均匀的固定，稍大的组织易形成固定梯度。

3. 脱水

（1）将OsO_4固定后的材料取出，在脱水以前要进行漂洗。用滤纸吸干净OsO_4固定液，用0.2mol/L的PB漂洗三次，每次10min。以避免在脱水时OsO_4与乙醇产生氧化还原反应，生成沉淀。

（2）将漂洗后的材料依次放入50%乙醇、60%乙醇、70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、90%乙醇与90%丙酮的1∶1混合液、100%丙酮，每级15～20min，充分除去组织中的水分。

4. 浸透

经脱水后的材料在包埋以前要经过浸透处理，即用包埋剂与脱水剂按浓度梯度分级换液，使包埋剂逐渐取代脱水剂渗透到组织中去，最终使组织细胞内所有空隙均匀充满包埋剂。

操作方法：在室温或37℃条件下，先将样品置入3∶1的100%丙酮与包埋剂的混合液，10～30min。相继分级换液：1∶1的100%丙酮与包埋剂混合液，30～60min；1∶3的100%丙酮与包埋剂混合液，1～2h或过夜；纯包埋剂，2～5h或过夜。

5. 包埋

包埋的目的是使充分浸透的1mm³左右的小块样品埋置于入树脂介质中，加温使包埋剂逐渐由单体聚合成高分子，样品与包埋剂一起获得高度的稳定性、均匀性，合适的硬度和弹性，以便制备切片。Epon812包埋操作如下：

（1）选择好包埋模具；硫酸纸条写好样品编号；

（2）用注射器往模具中注入少量包埋剂，置入写好样品编号的小纸条并使之贴壁；

（3）用牙签从渗透液中挑出样品块，放在模具顶部的中央；

（4）往模具中注满包埋剂；放入聚合器或恒温箱中聚合。聚合的温度和时间一般为

37℃ 12h，45℃ 12h，60℃ 24h。若样品已在纯包埋剂中渗透过，也可以直接升温至60℃聚合 48h；

(5) 关闭聚合器，待温度降至室温后取出包埋块，放入干燥器中保存。

6. 修块

在对包埋样品进行超薄切片之前，先要粗修包埋块。用超薄切片机修块的操作过程如下：

(1) 接通电源，打开照明灯。用样品夹夹紧包埋块，顶端露出 3～5mm；

(2) 把样品夹固定在修块台上，用单面刀片削去包埋块顶部及四周的包埋剂，暴露出组织；

(3) 用超薄切片机上的显微镜，边观察边用刀片进一步修整包埋块，使其顶端呈规整的四面锥体形。顶面平整光滑，呈梯形、长方形或正方形，上下两边严格平行。面积一般要小于 1mm×1mm，四个斜面的坡度在 45°左右。

说明：若需要作半薄切片进行光镜观察，锥体顶面的面积要尽量大一些，组织块的四周可保留一部分包埋剂，以保证组织块所有的结构不被丢失，以后再根据需要进行取舍。

7. 半薄切片

(1) 把粗修好的包埋块连同样品夹一起装在样品臂上；

(2) 把玻璃刀安装在刀座上，使刀刃与刀座上的标杆等高，调节刀的前角值在3°～5°，左右移动刀台选择合适的刀刃位置；

(3) 前后移动刀座使刀靠近样品块，旋转样品夹及刀座，使包埋块顶端平面的上下两边与刀刃三线平行；

(4) 通过双目显微镜边观察边用微调进刀，直到刀刃与包埋块顶端的平面在同一垂直面上，即刀刃刚刚能接触到组织为止（小心对刀，以免第一张切片太厚损伤样品臂）；

(5) 用注射器向刀槽内注入双蒸水，调节液面的高度直到获得一个合适的反光；

(6) 选择合适的切片速度与切片厚度，切出厚度为 0.5～2μm 的半薄切片；

(7) 将切片捞在滴有双蒸水的载玻片上，再放在加热板上使切片展平、烘干；

(8) 在切片上滴加 0.5%的甲苯胺蓝溶液染色 3～5min；

(9) 水冲洗掉多余的染液，晾干后树胶封片，光镜观察。

说明：半薄切片的作用：一是根据半薄切片精确定位，准确保留超薄切片位置，避免丢失有价值的结构；二是了解样品包埋质量，以确定是否继续做超薄切片；三是半薄切片可以得到比一般石蜡切片更清晰的图像，可进行定量形态学分析，方便与超薄切片对照观察研究。

8. 支持膜的制备

在铜网上制备 Formvor 支持膜的方法：

(1) 用三氯甲烷将 Formvor 配制成 0.2%～0.5%的溶液；

(2) 取平滑的玻璃条用乙醇洗净、绸布擦干垂直插入 Formvor 溶液中，停留片刻

后垂直向上取出，用滤纸吸去下沿多余的溶液，玻璃条上便形成一层均匀的薄膜；

(3) 自然干燥后用刀片沿着膜的四周（距离边缘2mm左右）划痕，在膜上轻轻哈气；

(4) 将附膜的玻璃条缓缓斜向插入双蒸水中（盛水的玻璃缸大、水多可增大浮力，便于操作），由于水表面张力作用，膜从玻璃条上脱落下来，漂浮在水面上；

(5) 将清洗干净的载网轻轻排放在厚薄均匀、干净及无皱折的膜上；

(6) 用比膜面积稍大的滤纸盖在膜上，随着滤纸吸湿，膜、载网和滤纸三者贴在一起；

(7) 镊子夹住滤纸的一边，迅速提起并翻转，放在洁净的培养皿中干燥备用。

9. 超薄切片制备

超薄切片厚度最佳值为50～70nm，观察干涉色，可以判断切片厚度，以确定捞取的切片。切片要求在防震、恒温和无较大气流流通的环境下进行。

(1) 光镜观察半薄切片，对包埋块作适当的再修整，重新选择刀刃，用上述方法对刀，选择合适的切削速度和切片厚度，以切出银白色的切片带为最佳。

(2) 用睫毛针将切片带断成几段并聚拢在一起，用镊子夹住载网的边缘，使载网与切片所在的水面平行，与切片接触并沾取切片后迅速提起，用滤纸吸去水滴，放在铺有滤纸的培养皿中，自然干燥后进行染色。

10. 电子染色

(1) 乙酸双氧铀可以与大多数细胞成分如核酸、蛋白质、结缔组织纤维结合，尤其易于与核酸结合，不易出现沉淀，对糖原、分泌颗粒和溶酶体等也有染色作用，具有放射性和化学毒性。染色步骤：

① 用滴管吸取铀染液滴在标有“铀”的专用蜡盘中；

② 用镊子夹起载网，使载网有切片的一面向下悬浮在液滴上，30min；

③ 用双蒸水充分清洗，之后将载网放在滤纸上，待稍干燥后再进行铅染。

(2) 枸橼酸铅是目前使用最多的铅盐染色剂，具有很高的电子密度，对各种细胞结构均有广泛的亲和力，尤其能提高细胞膜系统及脂类物质的反差，毒性较大，易与CO_2结合，产生碳酸铅沉淀污染切片。染色步骤：

① 用一只干净的滴管吸取枸橼酸铅染液滴在标有“铅”的专用蜡盘中；

② 蜡盘中放一些固体NaOH，用上述方法染色30min；

③ 用0.1mol/L NaOH溶液和双蒸水充分清洗，自然干燥后用TEM观察（图2-3）。

【实验结果】

几十个纳米的均一厚度的生物样品，大都是由碳、氢、氧、氮等低原子序数物质组成的结构，在TEM下很难获得“质量—厚度”反差成像。尽管在四氧化锇固定时，形成了一些结构间的“质量—厚度”差异，但不足以造成清晰的高反差像。所以，“电子染色”是非常必要的。它利用重金属盐（铀盐和铅盐）与组织细胞内的微细结构发生不同程度的结合，提高结构间的“质量—厚度”差异，进而造成电子散射的强弱对比，以形成具有丰富灰度级的高反差透射电子显微像。所以从某种意义上可以说，一幅透射电

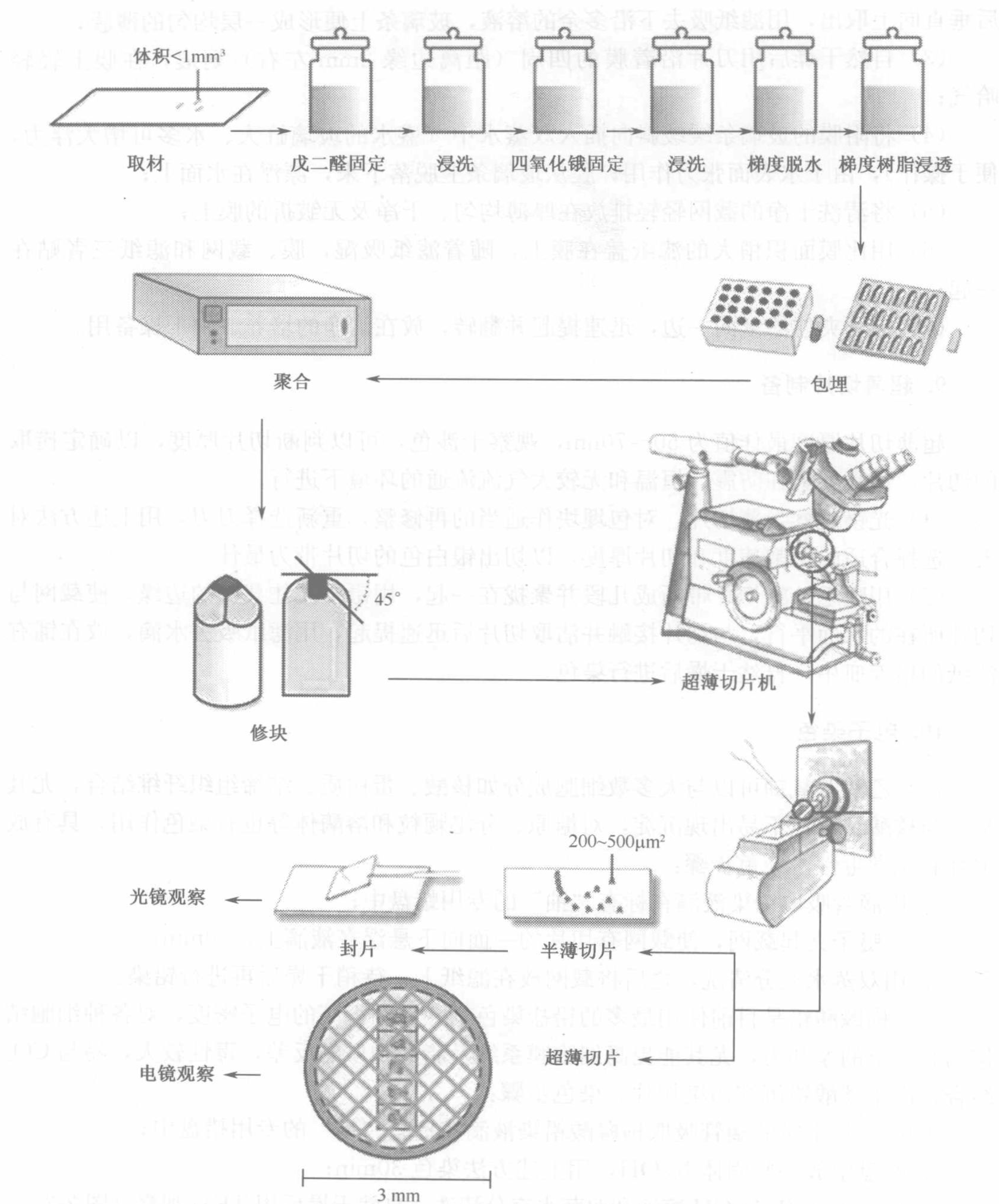


图 2-3　超薄切片样品制备过程示意图（李伯勤提供）

子显微图也是电子染料的分布图（图 2-4）。

2.2.2　TEM 负染色技术

【实验原理】

负染色是一种反衬染色，即利用重金属盐包绕低电子密度的样品，增强样品四周的电子密度，造成微细结构之间的“质量—厚度”差异，增强散射吸收反差，使样品在黑

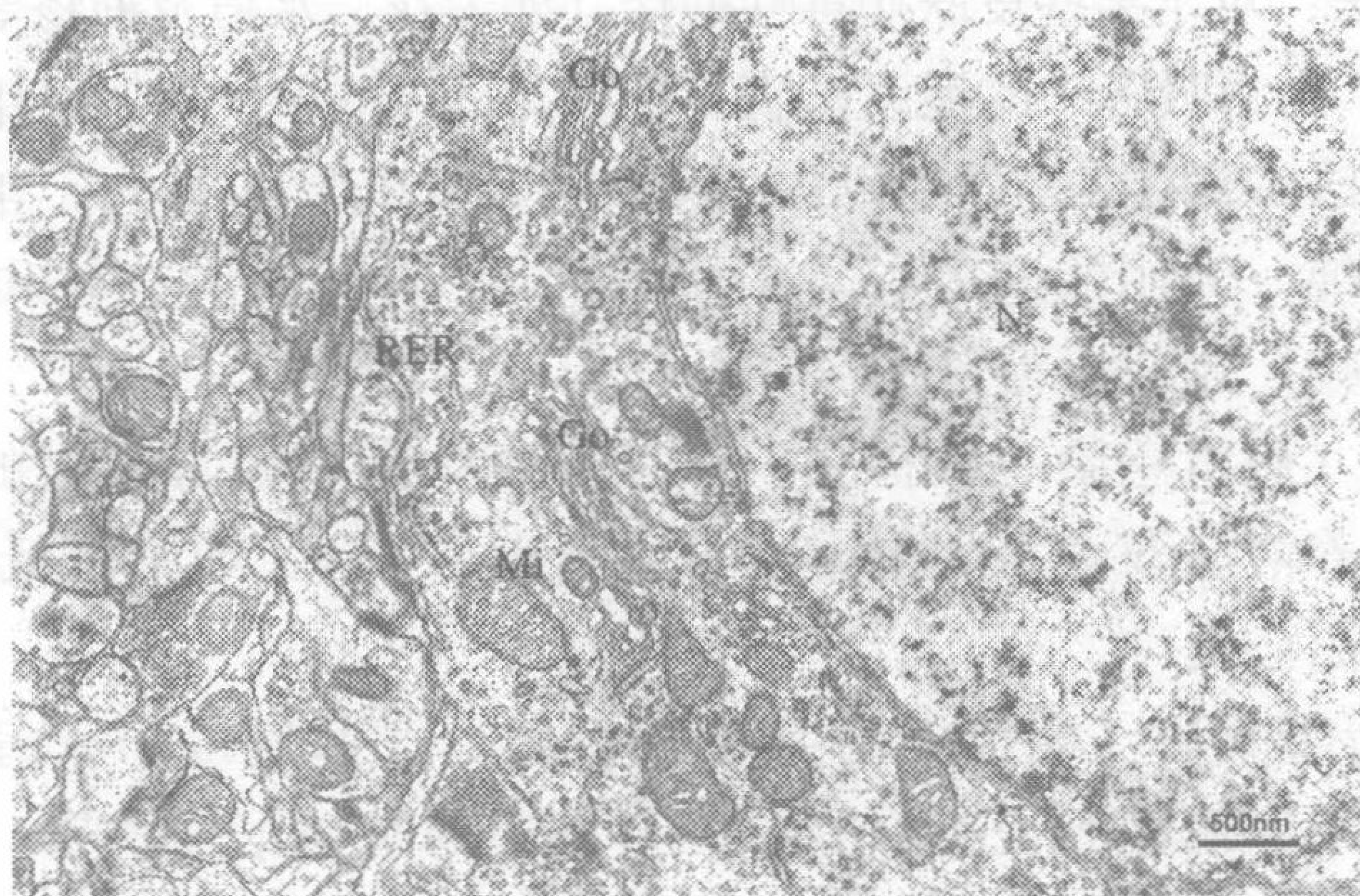


图 2-4　大鼠皮质神经元及周围的神经纤维网络（李伯勤提供）

由微细结构之间的电子密度差异，获得 TEM 清晰的亚细胞形态，可见细胞核、线粒体、内质网、高尔基复合体、内致密板层、突触和突触小泡等

暗的背景上呈现明亮结构。

良好的负染色液具备较高的电子密度和较强的电子散射能力（染料的电子密度比样品的密度高 4 倍以上）。溶解度高，不易析出沉淀。熔点较高，在电子束照射下不升华。分子细小，容易在不规则的样品表面渗透，与样品不发生化学反应。

采用负染色方法，图像反差强、分辨率高，制作简单，适宜于显示大分子、细菌、病毒、原生动物、噬菌体、亚细胞碎片、分离的细胞器、核酸大分子、蛋白质晶体及其他大分子材料。

【实验用品】

（1）试剂：0.2mol/L PB、双蒸水、1%～3%磷钨酸水溶液（pH 4.5～5.5）、甲酸铀、乙酸铵、磷钼酸、1mol/L NaOH。

（2）材料：脂质体、核酸分子、微管或其他细胞器等。

【方法与步骤】

1. 负染色液配制

最常用的负染色液是磷钨酸的水溶液：浓度 1%～3%，pH 为 1.0 左右，用 1mol/L NaOH 调 pH 至 6.4～7.0，以免损伤标本。

说明：负染色液一般均由重金属盐配制。染色液的 pH 一般以偏酸性效果较好，但不同的标本要求不同，可通过实验确定最佳 pH。乙酸铀、甲酸铀和钼酸铵等亦可用于负染色。乙酸铀用 0.2%～0.5%水溶液（pH4.5～5.5），临用前配制并调 pH 至 5.5；甲酸铀配成 0.5%～1%溶液（pH3.5），使用时用 NaOH 调 pH 至 4.5～5.2。钼酸铵配制成 2%～3%溶液，使用时用乙酸铵将 pH 调至 7.0～7.4。

2. 取材

负染色样品取自悬浮液，但样品必须达到一定的浓度和纯度，才能与染色剂之间产生特异和清晰的结合反应。为此，常采用几种取材方法。

(1) 直接取材法：对于某些皮肤病毒性疱疹（如天花、水痘及疱疹等）可用毛细吸管直接刺入疱疹中取样，再将吸管中的泡液，滴在带有支持膜的载网上，可用于临床快速诊断。

(2) 离心提纯法：用于细菌、病毒、噬菌体等微生物的提纯，细胞匀浆中线粒体、微管等细胞器的提纯。先用低速离心（3000r/min），弃去较大杂质和细胞碎片，再经低温超速离心取沉淀物，制成悬浮液。

(3) 细胞培养（病毒感染）取材法：从培养瓶中刮下病毒感染的细胞，低速离心，弃上清液，加入培养液与双蒸水的混合液（比例为 1∶4），细胞由低渗导致破裂，释放病毒，然后按上述离心提纯。

(4) 抗体-病毒凝集法（即负染色免疫电镜法）：某些病毒如鼻病毒、风疹病毒、小儿腹泻轮状病毒及甲、乙型肝炎抗原等，可与相应的抗体形成病毒-抗体复合物，经离心沉淀浓缩取沉淀物，可找到较多的病毒，广泛用于病毒疾病的快速诊断。

3. 染色

(1) 滴染法：将样品悬浮液直接滴于带有支持膜的载网上。静置 3～5min，用滤纸条从液滴边缘吸去多余液体，待稍干燥后滴加染液，2～3min 后吸去多余染液，自然干燥后进行 TEM 观察。

(2) 漂浮法：先将带有支持膜的载网置样品液滴上漂浮以沾取样品，然后，再置于染液液滴上漂浮，1～2min 后，滤纸吸干，待自然干燥后观察（图 2-5）。

【实验结果】

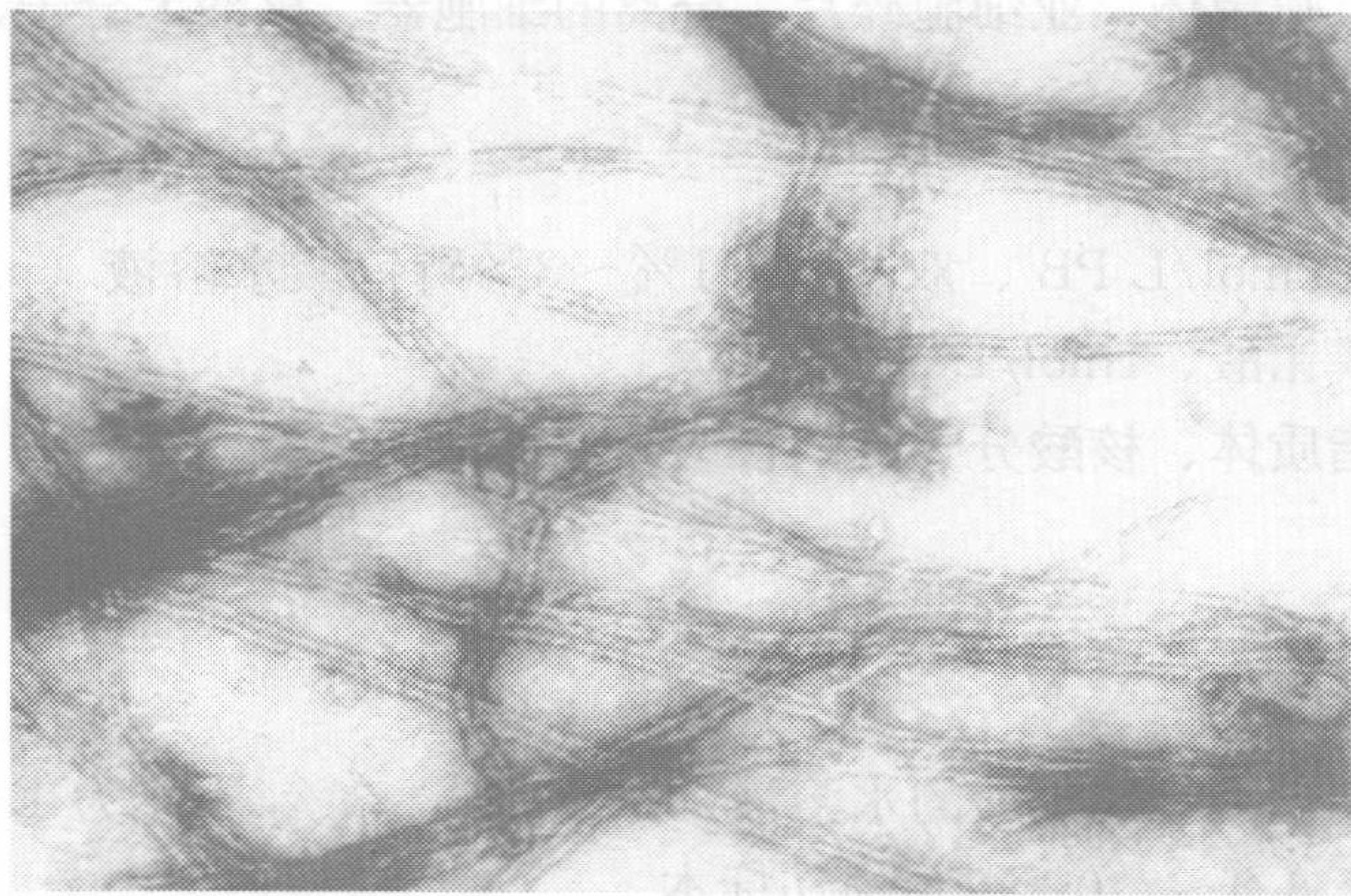


图 2-5　分离提取的神经元微管负染色 TEM 照片（李伯勤提供）

2.2.3　TEM 细胞化学技术

电镜细胞化学也称为超微结构细胞化学，是在超微结构原位显示化学反应和化学成分的一类实验方法，是电镜技术与细胞化学结合的产物，是组织化学技术的延续和发展。

在一般超薄切片上已经能够直接观察到许多化学成分，如糖原、核糖体、染色体 DNA 链和脂滴等，但大部分化学成分不能显示。TEM 细胞化学技术采用某种化学反应产物在超微结构局部形成高电子密度的不溶性沉淀物，在电镜下被观察到。基于这一点，可以把电镜酶细胞化学、免疫电镜细胞化学、超微示踪标记技术、电镜放射自显

影、冷冻蚀刻细胞化学等，统归属于TEM细胞化学技术的范畴。

2.2.3.1 TEM酶细胞化学

【实验原理】

TEM不能直接观察酶，而用酶细胞化学反应所形成的高电子密度沉淀物可以显示酶的活性。实现酶的超微定位，必须做到两点：一是要保存酶活性和细胞超微结构；二是在原位显现。一般电镜酶化学反应步骤分为酶反应和捕捉反应两步，即在一定的条件下先使细胞内的酶作用于底物形成初级反应产物（酶反应），再用化学物质（捕捉剂）与初级产物反应，产生不溶性的高电子密度沉淀（捕捉反应），以在TEM下观察。

【实验用品】

1. 用品

除了一般制备超薄切片所需要的用品之外，还应准备：0.2mol/L二甲胂酸钠缓冲液、0.05mol/L Tris 缓冲液、0.1mol/L乙酸钠缓冲液、PIPES缓冲液、Levamisole 、顺丁烯二酸盐缓冲液、Tris-马来酸缓冲液、10%多聚甲醛、戊二醛和多聚甲醛混合固定液、β-甘油磷酸钠、DAB、DMSO 、PAS、NaOH、HCl、氟化钠、$MgSO_4$、$MgCl_2$、$CeCl_2$、UDPG、还原谷胱苷肽、酒石酸、冰乙酸、铁氰化钾、硫酸铜、硝酸铅、蔗糖、去离子水。

2. 试剂配制

1）0.2mol/L二甲胂酸钠缓冲液

A液：0.2mol/L二甲胂酸钠［Na $(CH_3)_2 \cdot 3H_2O$］水溶液

Na $(CH_3)_2 \cdot 3H_2O$ 42.8g，加双蒸水至1000ml

B液：0.2mol/L HCl

浓盐酸（37%，相对密度1.19）16.8ml，加双蒸水至1000ml

根据不同要求，按A液和B液的不同配比，可得不同pH的0.2mol/L二甲胂酸钠缓冲液。如果配制200ml的0.2mol/L二甲胂酸钠缓冲液：取50ml A液，根据所需pH按表2-2加入B液，再加入双蒸水至200ml（也可以用0.1mol/L二甲胂酸钠缓冲液）。

表2-2 B液加量（对应pH）

pH	5.2	5.4	5.6	5.8	6.0	6.2	6.4	6.6	6.8	7.0	7.2	7.4
B液/ml	45.0	43.0	39.2	34.8	29.6	23.8	18.3	13.3	9.3	6.3	4.2	2.7

2）0.05mol/L Tris -HCl缓冲液

A液：0.2mol/L Tris

Tris（相对分子质量121.14）2.428g，加双蒸水至100ml

B液：0.1mol/L HCl

浓盐酸（37%，相对密度1.19）0.84ml，加去离子水至100ml

根据不同要求，按A液和B液的不同配比，可得不同pH的0.05mol/L Tris缓冲液。如果配制100ml的0.05mol/L Tris缓冲液：取25ml A液，根据所需pH按表2-3加入B液，再加入双蒸水至100ml。

表 2-3　B 液加量（对应 pH）

pH	7.19	7.36	7.40	7.54	7.60	7.66	7.77	7.87	7.96
B 液/ml	45.0	42.5	41.4	40.0	38.4	37.6	35.0	32.5	30.0

3）0.05mol/L 顺丁烯二酸盐缓冲液（maleate buffer）

A 液：0.2mol/L 顺丁烯二酸盐水溶液

顺丁烯二酸（$C_4H_4O_4$）24.8g，或无水顺丁烯二酸（$C_4H_2O_3$）21.2g；NaOH 8g，加双蒸水至1000ml

B 液：0.2mol/L NaOH 水溶液

NaOH 8g，加双蒸水至 1000ml

根据不同要求，按 A 液和 B 液的不同配比，可得不同 pH 的 0.05mol/L 顺丁烯二酸盐缓冲液。如果配制 200ml 的 0.05mol/L 顺丁烯二酸盐缓冲液：取 50ml A 液，根据所需 pH 按表 2-4 加入 B 液，再加入双蒸水至 200ml。

表 2-4

pH	5.2	5.4	5.6	5.8	6.0	6.2	6.4	6.6	6.8
B液/ml	7.2	10.2	15.3	20.8	26.9	33.0	38.0	41.6	44.4

4）0.2mol/L Tris- 顺丁烯二酸盐缓冲液

A 液：0.2mol/L Tris-顺丁烯二酸盐水溶液

顺丁烯二酸（$C_4H_4O_4$）	23.2g，或无水顺丁烯二酸（$C_4H_2O_3$）19.6g
Tris	24.2g
双蒸水至	1000ml

B 液：0.2mol/L NaOH 水溶液

NaOH	8g
双蒸水至	1000ml

根据不同要求，按 A 液和 B 液的不同配比，可得不同 pH 的 0.05mol/L Tris- 顺丁烯二酸盐缓冲液。如果配制 200ml 的 0.05mol/L Tris- 顺丁烯二酸盐缓冲液：取 50ml A 液，根据所需 pH 按表 2-5 加入 B 液，再加入双蒸水至 200ml。

表 2-5

pH	5.2	5.4	5.6	5.8	6.0	6.2	6.4	6.6	6.8
B液/ml	7.2	10.2	15.3	20.8	26.9	33.0	38.0	41.6	44.4

5）0.1mol/L 乙酸钠缓冲液

A 液：0.2mol/L 乙酸

冰乙酸（99%～100%，相对密度 1.050～1.054）11.5ml，加双蒸水至 1000ml。

B 液：0.2mol/L 乙酸钠水溶液

乙酸钠（$C_2H_3O_2Na$）16.4g（或 $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ 27.2g）加双蒸水至 1000ml。

根据不同要求，按 A 液和 B 液的不同配比，可得不同 pH 的乙酸钠缓冲液。如果

配制100ml的0.1mol/L乙酸钠缓冲液，可按表2-6配制。

表2-6

pH	4.2	4.4	4.6	4.8	5.0	5.2	5.4	5.6
A液	36.8	30.5	25.5	20.0	14.8	10.5	8.8	4.8
B液	13.0	19.5	24.5	30.0	35.2	39.5	41.2	45.2
加双蒸水至/ml	100	100	100	100	100	100	100	100

6）10%多聚甲醛

多聚甲醛2.5g加入25ml双蒸水，加热至60～70℃，摇动至溶解，滴加1mol/L NaOH至清亮，冷却备用。

7）戊二醛和多聚甲醛混合固定液

0.1mol/L二甲胂酸钠缓冲液（pH7.2） 50ml
2.5%戊二醛 4ml
4%多聚甲醛 46ml
双蒸水至 100ml

【方法步骤】

1. 取材

取材方法同常规TEM技术。

2. 固定

常用灌注固定法。固定液首选戊二醛和多聚甲醛混合液，适于同时保存酶活性和超微结构。固定温度应为4℃。固定时间必须根据酶对固定剂的敏感程度而定，一般可在5～30min。初固定后应充分的清洗，洗液用配制固定液的缓冲液，4℃，数小时或过夜。另外，应注意固定液的浓度和渗透压，因为它们直接影响超微结构和酶活性，一般要求固定液的渗透压略高于体液（290mOsm①）。

3. 厚切片

经缓冲液冲洗后，可直接用冷冻切片机或振动切片机切片，厚度为40～50μm，然后进行电镜细胞化学反应。

4. 缓冲液置换

将组织置入合适的缓冲液中，4℃，一般2～3次，每次5～15min。

说明：缓冲液应具有良好的缓冲能力，以对抗水解释放出来的酸或碱。酶电镜细胞化学常用的缓冲液为：PB、Tris、乙酸缓冲液、盐酸缓冲液和二甲胂酸钠缓冲液等，应根据化学反应、缓冲的pH范围和程度而选择使用，避免使用减弱目标酶活性的缓冲

① Osm：渗透压克分子Osmole，用于计量特殊液体的微粒数。

液。如K-依赖性磷酸酶，Na对其有抑制作用，则应去掉钠；检测磷酸酶活性时，最好不使用磷酸缓冲液。一般来说，PB适合中性（pH7.0）的缓冲，但反应中如有钙离子参与最好不用磷酸盐缓冲液，以免钙与磷酸基起反应。Tris属于氨基缓冲液，由于氨基与醛基发生化学反应，所以此两类试剂不能在一起使用。缓冲液的渗透压注意与反应的捕捉机制相符，避免造成细胞器的膨胀和收缩。漂洗、固定与孵育过程应采用同一种缓冲液。

5. 孵育及孵育液

电镜酶细胞化学的核心步骤是孵育，而孵育液的组成和浓度比例要求非常严格，应含有浓度充分的酶作用底物、捕捉剂和激活剂，对照实验应加入抑制剂，应有最佳pH和良好的缓冲液系统。根据目标酶选择并新配制孵育液，将样品置入后在振荡恒温水浴箱中孵育。孵育温度和时间要根据目标酶和样品确定。

注意事项：化学试剂必须用保证试剂（GR），最低应为分析纯（AR），底物要求更为严格；孵育液必须临用前配制；所用器皿要特别干净，避免和金属接触；孵育液配好后应再次调整pH；最好在振荡恒温水浴箱中孵育，不断振荡孵育液；为了把握好孵育时间和效果，最好在孵育过程中的不同时间段取出部分切片进行光镜检查，以确定最佳孵育时间。

6. 漂洗

孵育后将标本在缓冲液中清洗20～60min，换液2～3次，一般先用与孵育液同系列的缓冲液，再用0.1mol/L二甲胂酸钠缓冲液漂洗，以去除附于样品上的孵育液。

7. 后固定

1%OsO_4后固定，4℃，60min左右。OsO_4不仅起后固定作用，还有锇化作用，以增加图像的反差。

8. 超薄切片制备

按常规超薄切片技术进行脱水和包埋。切片厚度不宜太薄，以70～90nm为好。为了确定酶细胞化学反应程度和最佳区域，可先做半薄切片（1μm），或薄切片（3～5μm）。

9. 染色

普通TEM超薄切片要经过饱和的乙酸双氧铀和柠檬酸铅双染色，而酶细胞化学样品中已经产生了高电子密度的反应物质，所以要十分慎重，可先观察未经染色的切片，视需要再决定是否进行染色、单染还是双染。一般采用单染铀，易于分辨酶活性部位。

【常用实验举例】

1. 碱性磷酸酶

碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）是广泛存在动物组织中的一种分子质量

为100～200kDa的含锌水解酶，位于细胞膜上，为非特异性磷酸酶，能水解所有的磷酸单酯而释放出磷酸，其催化活动要求镁离子存在，利用甘油磷酸钠为底物，镁盐为捕捉剂，并经柠檬酸铅处理，最后形成磷酸铅沉淀，在TEM下显示高电子密度。

固定液：

多聚甲醛	2%～4%
戊二醛	0.5%～2%
二甲胂酸钠缓冲液（pH7.2）	0.1mol/L
蔗糖	8%

在0～4℃固定1h。

孵育液：

蔗糖	0.8g	使最终浓度为8%
0.1mol/L（3%）β-甘油磷酸钠	60mg	20mmol/L（最终浓度）
双蒸水	2.0ml	
0.2mol/L Tris-HCl缓冲液（pH8.5）	1.4ml	28mmol/L（最终浓度）
0.015mol/L $MgSO_4$液	2.6ml	3.9mmol/L（最终浓度）
0.5%柠檬酸铅（pH10.0）	4.0ml	2.0mmol/L（最终浓度）

共计10ml，用0.1mol/L NaOH调至pH 9.2～9.4

反应条件：孵育液pH 9.4，37℃，15～30min。

注意：要按上述顺序加入试剂，当加柠檬酸铅时应非常缓慢，边加边搅拌。

对照：①介质中除去底物β-甘油磷酸钠；②介质中含有碱性磷酸酶抑制剂Levamisole 2.5mmol/L。为了保证完全抑制，切片可先在2.5mmol/L Levamisol（溶于0.1mol/L二甲胂酸钠缓冲液内）中，于4℃下处理30min。阴性反应。

2. 酸性磷酸酶

酸性磷酸酶（acid phosphatase，ACP）分为两类：溶酶体ACPases和非溶酶体ACPases，前者位于溶酶体内，可被酒石酸盐和氟化钠抑制，后者主要位于质膜、内质网膜和高尔基复合体上，对上述抑制剂不敏感。常用金属盐捕捉法显示ACPases的活性。TEM下呈现高电子密度黑色沉淀，常作为溶酶体的标志酶。

固定液：

多聚甲醛	2%～4%
戊二醛	0.25%～1%
PIPES缓冲液（pH7.4）	30mmol/L
蔗糖	8%

在0～4℃固定1h。固定后的样品在PIPES缓冲液（pH7.4，8%蔗糖，10%DMSO）中漂洗，不超过12h。

孵育液配制

0.05mol/L 乙酸钠缓冲液（pH5.0）	20ml
硝酸铅	120mg
蔗糖	2.4g

3%β-甘油磷酸钠　　10ml

反应条件：孵育液最终 pH5.0～5.2，37℃，15～30min，不断振荡。

注意：孵育液要在反应前配制，先将蔗糖和硝酸铅溶于乙酸钠缓冲液，然后一边搅拌一边缓缓加入 3%β-甘油磷酸钠，严格检测 pH，如有升高，用 HCl 调整，使 pH 不超过 5。

对照：①在不含底物的介质中孵育；②在含有 10mmol/L 氟化钠或 10mmol/L 酒石酸盐的介质中孵育以抑制溶酶体 ACPases；③在含有 1μmol/L（氯汞苯甲酸）(chloromercuribenzoate）的介质中孵育以抑制非溶酶体 ACPases；④孵育后的漂洗液用上述 PIPES 缓冲液，漂洗时间宜短；后固定液（锇酸）也用 PIPES 缓冲液配制。阴性反应。

3. 葡萄糖-6-磷酸酶

葡萄糖-6-磷酸酶（glucose-6-phosphatase，G-6-Pase）的功能是把葡萄糖-6-磷酸水解成葡萄糖和磷酸，所以可用重金属捕捉剂来显示这种酶。反应产物主要分布于内质网和核膜，是内质网的标志酶之一。

固定液：

戊二醛	2%
二甲胂酸钠缓冲液（pH7.2）	0.1mol/L

经灌注固定的样品置于含 8%蔗糖的二甲胂酸钠缓冲液内浸泡 1h。

孵育液：

葡萄糖-6-磷酸酶	4mmol/L
二甲胂酸钠缓冲液（pH7.2）	50mmol/L
Pb（NO_3）$_2$	3mmol/L
蔗糖	350mmol/L

反应条件：孵育液 pH6.7，37℃，时间根据细胞所含酶活性高低而定，一般 15～90min。

对照：①在不含底物的介质中孵育；②在进入孵育液之前，先在 0.1mol/L 乙酸缓冲液（pH5.0）中于 37℃下浸泡 15min。阴性反应。

4. 焦磷酸硫胺素酶

焦磷酸硫胺素酶（thiamine pyrophosphatase，TPPase）电镜细胞化学反应产物，主要分布于高尔基复合体的扁平囊泡，TPPase 是高尔基复合体的标志酶之一。

固定液：

多聚甲醛	2%
戊二醛	0.25%～1%
PIPES 缓冲液（pH7.2）	0.03ml/L

在 0～4℃固定 30～50min。固定后的样品在 PIPES 缓冲液（pH7.4，8%蔗糖，10%DMSO）中漂洗，不超过 12h。

孵育液：

双蒸水	2.0ml
蔗糖	0.8g（终浓度 240mmol/L）

0.2mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH8.5）	1.4ml（终浓度 28mmol/L）
氯化焦磷酸硫胺素	9.0mg（终浓度 2.0mmol/L）
15mmol/L $MgCl_2$	2.6ml（终浓度 3.9mmol/L）
0.5% 柠檬酸钠	4.0ml（终浓度 2.0mmol/L）
Levamisole	6.0mg（终浓度 2.5mmol/L）

反应条件：孵育液 pH9.2，37℃，30～60min。

对照：孵育液中去除底物，阴性反应。

5. 三磷酸腺苷酸酶（adenosine triphosphatase，ATPase）

Na^+，K^+-ATPase 电镜细胞化学反应产物分布在质膜上，水解 ATP 以在质膜内外建立并维持 Na^+，K^+ 的浓度梯度。在钾和镁离子存在的条件下，ATPase 水解 NPP，所以 NPP 作底物可以检测 K-NPPase 活性，借以定位 K^+-ATPase。

固定液：

多聚甲醛	2%
戊二醛	0.5%
PIPES 缓冲液（pH7.2）	0.05mmol/L

在 0～4℃ 固定 30～60min。固定后的样品在 0.05mmol/L PIPES 缓冲液（pH7.2，8%蔗糖，10%DMSO）中漂洗过夜。

孵育液配方：

ATP-Na	5mg
0.2mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH7.2）	4ml
0.1mol/L $MgSO_4$	1ml
双蒸水	4.4ml
2% Pb $(NO_3)_2$	0.6ml
蔗糖	1.8g

反应条件：孵育液 pH7.2，37℃，15～60min。

ATPase 反应产物在电镜下为高电子密度的磷酸铅微粒沉淀。动物组织中有多种 ATP 酶，其分布及定位可因激活剂与抑制剂的不同而稍有差异。例如：

① 肌球蛋白 ATPase：其激活剂是 Ca^{2+}，最适 pH 为 9.0。酶活性定位于 A 带或 Z 带，或 A、Z 两带均为阳性。

② 细胞膜 ATPase：有用 Mg^{2+} 激活的 Mg^{2+}-ATPase，还有被 Na^+、K^+ 激活的 Na^+，K^+-ATPase。酶活性主要见于质膜以及某些血管内皮的吞饮小泡等处。

③ 线粒体 ATPase：Mg^{2+} 可激活心肌的线粒体 ATPase，而 Mg^{2+}、Ca^{2+} 均可激活肝线粒体 ATPase。酶活性主要见于线粒体基质和内膜的基粒。

6. 5′-核苷酸酶

5′-核苷酸酶（5′-NT）电镜细胞化学反应产物分布在质膜上，能使 5′-单核苷酸脱磷酸产生核苷和无机磷，可用铈盐捕捉磷酸根来显示 5′-核苷酸酶。

固定液：

戊二醛	1%
Tris-马来酸缓冲液（pH6.0）	0.1mol/L

说明：固定液随样品而异。

孵育液：

Tris-马来酸缓冲液（pH6.0）	100mmol/L
$CeCl_2$	2mmol/L
$MgCl_2$	2mmol/L
5′-单磷酸腺苷	1mmol/L
Levamisole	1mmol/L
蔗糖	145mmol/L

反应条件：孵育液 pH7.2～7.4，37℃，时间在实验过程中确定。

对照：①介质中去掉底物；②介质中去掉 Mg^{2+}，加入 EDTA。反应明显减弱或为阴性。

注意：如果孵育液有沉淀，应过滤后再用，孵育过程中应定时更换液体。

7. 琥珀酸脱氢酶

琥珀酸脱氢酶（succinate dehydrogenase，SDH）是三羧循环过程中一个主要氧化还原酶，其细胞化学反应产物仅分布在线粒体内膜（包括嵴膜）上，所以是线粒体的标志酶之一。

固定液：

多聚甲醛	1%
戊二醛	0.25%

4℃，固定 30min

孵育液：

0.1mol/L 磷酸缓冲液（pH7.0）	6.3ml
0.1mol/L 柠檬酸钠	0.3ml
30mmol/L 硫酸铜	1.0ml
双蒸水	0.7ml
5mmol/L 铁氰化钾	1.0ml
蔗糖	1g
DMSO	0.5ml

反应条件：孵育液 pH7.0，22℃，10～90min。

对照：①在孵育液中不加底物；②在孵育液中加入抑制剂，如丙二酸钠。反应阴性。

注意：在反应产物电子密度欠高时，可在孵育液中加入 0.5～0.8mmol/L 的 phenazine methosulfate（PMS），不仅可以增强反应产物的密度，而且可以减少假阳性。

8. 细胞色素氧化酶

细胞色素氧化酶（cytochrome oxidase）是呼吸链末端的氧化还原酶，其细胞化学

反应产物分布在线粒体外腔，所以也是线粒体的标志酶之一。

固定液：

戊二醛（PB缓冲，pH7.4）	2%
4℃，固定10min	

孵育液：

DAB	5mg
0.1mol/L PB缓冲液（pH7.4）	5ml
双蒸水	5ml
过氧化氢酶	5mg
细胞色素c	5mg

反应条件：孵育液pH7.4，37℃，30～60min，不断振荡。

对照：在孵育液中加入10mmol/L的NaN_3，抑制酶反应。

注意：在固定过程中，戊二醛不纯、固定时间太长或者没有固定等，均不能得到反应产物显示。

9. 过氧化氢酶

过氧化氢酶（catalase）是过氧化氢的清除剂，可分解过氧化氢产生氧和水，在H_2O_2存在的条件下，过氧化氢酶可催化醇、酚、亚硝酸盐、醛、甲酸等的过氧化反应。电镜细胞化学采用碱性DAB法显示此酶。

固定液：

戊二醛（PB缓冲，pH7.4）	2%
4℃，至少固定4h，不断振荡	

孵育液A（调pH为中性）：

30%H_2O_2	1ml（1%）
PB缓冲液	29ml

孵育液B（调pH9.7）：

DAB-4HCl盐	30mg（0.1%）
0.1mol/L 2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇	15ml
双蒸水	12ml
30%H_2O_2	1ml
0.1mol/L NaOH	2.1ml

反应条件：先在孵育液A中孵育10min，然后转入孵育液B中，37℃，60min，不断振荡。孵育反应后充分漂洗（用PB缓冲液），1%锇酸后固定。

对照：样品在0.5mg/ml过氧化氢酶的无H_2O_2的DAB介质中孵育，以排除介质中内源性过氧化物。

10. 糖基转移酶

糖苷链是在糖基转移酶（glycosyl transferase）的催化下形成的，把含有糖基转移酶的样品置入含有尿苷5′-二磷酸葡萄糖（UDPG）和引物的介质中孵育，细胞内就会合成葡聚

糖，颗粒直径一般小于 20nm，充满整个细胞质基质，很容易在 TEM 下观察到。

孵育液：

UDPG	100ml
G-6-P	100ml
糖原	10mg
还原谷胱苷肽	2mg
$MgCl_2$	2mg
Tris 缓冲液（pH8.4～9.0）	10ml
双蒸水	15ml

制备要点：

样品置入孵育液，37℃，孵育 30min（未经固定）

2.5%戊二醛固定 30min

某些样品要置入 α-或 β-淀粉酶溶液中 30min

1%锇酸后固定

脱水过程要快速

半薄切片时做 PAS 染色定位

说明：经 α-淀粉酶处理的样品 PAS 染色阴性；经 β-淀粉酶处理的样品 PAS 染色明显减弱；当介质中不含 UDPG 时，PAS 染色和葡聚糖颗粒均为阴性。

【实验结果】

见图 2-6。

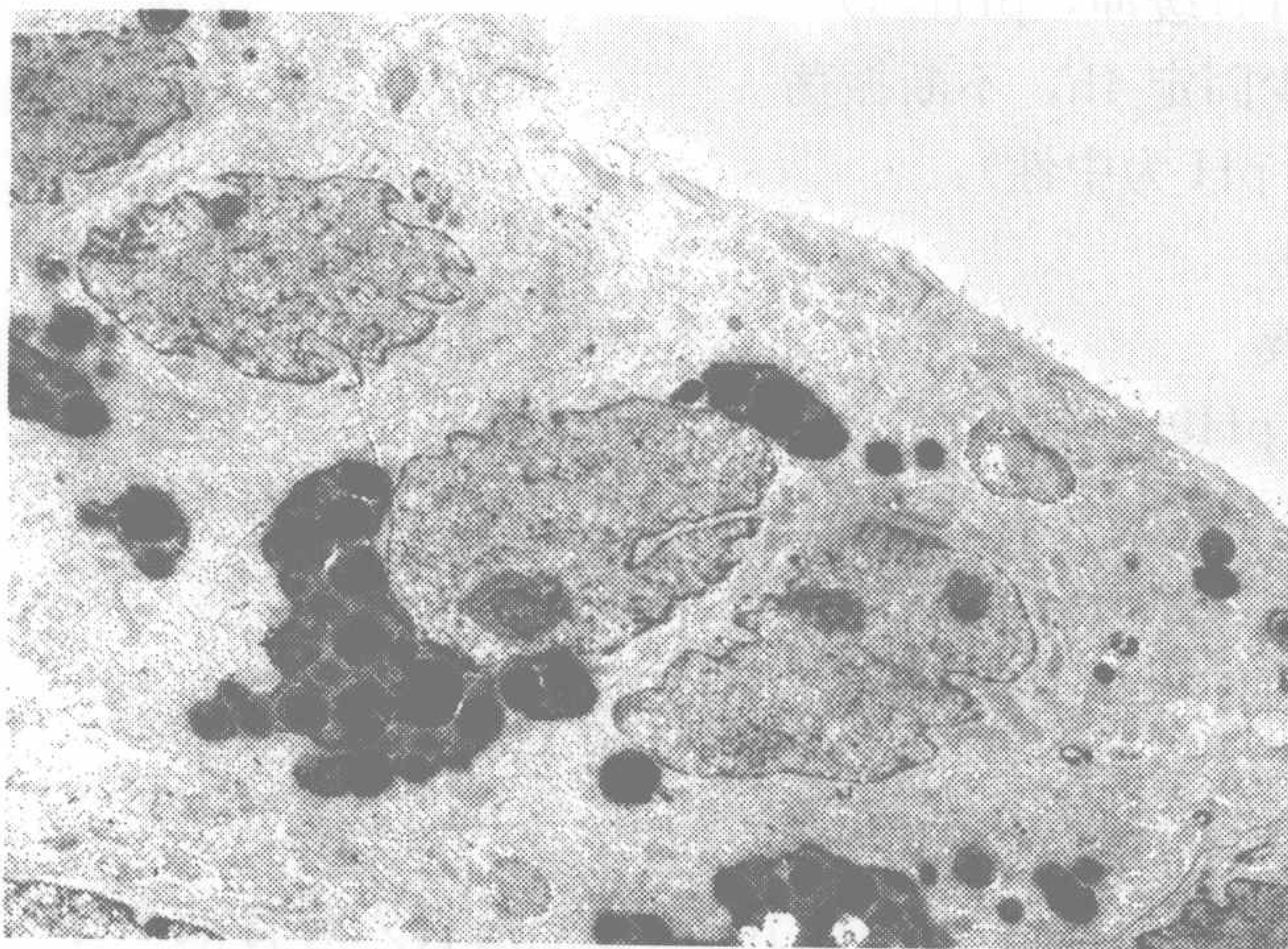


图 2-6 大鼠子宫内膜酸性磷酸酶细胞化学 TEM 照片：酶反应部位呈高电子密度（李伯勤提供）

2.2.3.2 TEM 免疫细胞化学技术

【实验原理】

免疫电镜技术即超微结构免疫细胞化学技术。TEM 免疫细胞化学技术则是把光镜

免疫细胞化学技术与 TEM 技术结合起来，在超微结构水平上研究抗原抗体反应，进行抗原定性和定位的一种技术。包括免疫酶标抗体技术、胶体金标记免疫电镜技术、蛋白 A-铁蛋白标记技术等多种方法。以下简介 TEM 免疫细胞化学技术的一般方法及几种常用样品制备过程。

【实验用品】

除了一般超薄切片和酶电镜细胞化学制备所需要的试剂之外，还应准备：免疫血清、标记物、抗体、免疫电镜常用固定液、免疫电镜常用包埋剂如 Monomer、Crosslinker、Initator 等。

【方法与步骤】

1. 取材和固定

免疫电镜技术对取材和固定提出了更高的要求，既要保存良好的超微结构，又要保持组织的抗原性。因此，取材力求保持组织新鲜，固定方法可采用灌注法和浸入法，对于培养细胞与分离的血细胞要随用随取，取后或分离后应立即离心，弃上清，进行固定。固定剂不宜太强。戊二醛是一种常用的固定剂，但对细胞抗原活性有一定影响，与戊二醛相比，甲醛对抗原活性影响较小。常用 4%多聚甲醛与低浓度戊二醛混合固定液。过碘酸-赖氨酸-多聚甲醛也是一种常用固定剂。配制固定液所用缓冲液多为二甲砷酸钠，因砷酸盐可较快地使细胞呼吸停止。四氧化锇在免疫电镜中大多数仅用于包埋前法，以提高免疫标记样品的反差。

常用固定液：

(1) 4%甲醛- 0.05%～0.5%戊二醛混合固定液

20%甲醛	2ml
25%戊二醛	0.02～0.2mol/L
0.2mol/L PB	6ml
双蒸水加至	10ml

注意：戊二醛的浓度要根据所研究的抗原的敏感程度灵活调整。

(2) PLP 固定液

20%甲醛	1ml
0.1mol/L 高碘酸钠	1ml
1mol/L 赖氨酸	0.75ml
0.2mol/L PB	0.85ml
双蒸水加至	10ml

说明：上述配方只是免疫电镜常用固定剂，实际操作中必须根据所研究的样品和抗原灵活选择和调配。对于一个不明确固定液耐受能力的抗原，要经过系列实验确定其最合适的固定液成分和浓度。一般固定时间不宜太长，以 4℃条件下处理 1～2h 为宜。

2. 包埋

在免疫电镜技术中，对包埋过程和包埋剂除了一般超薄切片所要求的基本条件（适当的硬度和塑性、无电镜结构、收缩率低、耐受电子束）外，则主要侧重于如何保存抗原性。

1）环氧树脂包埋

目前普遍采用环氧树脂包埋法，样品在脱水后进入包埋操作，采用37℃ 12h，45℃ 48h聚合。

说明：环氧树脂包埋法方便，可用于包埋前免疫反应；如果用于包埋后免疫反应，仅适合于少部分抗原。活跃的环氧基可与抗原分子中的很多基团发生反应而致抗原失活。此外，环氧树脂聚合时，需要加温到60～80℃，高温（聚合温度不宜超过50℃）会使很多抗原分子变性。再者，环氧树脂是一种疏水材料，那些幸免于失活和变性的抗原分子处于一种疏水的环境中，使之很难与水溶性的标记试剂结合而影响成功的标记。上述三点限制了环氧树脂在免疫电镜技术中的应用，同时也是使用环氧树脂包埋时必须注意的问题。

2）Lowicryl K_4M 低温包埋

Lowicryl K_4M 用于免疫电镜的优点：丙烯酸类树脂不含环氧基；可以在低温和光照射（紫外光，波长360nm）下聚合；具有亲水性，能较好地保持组织结构和抗原性，减少背景染色。所以，特别适合于免疫细胞化学。K_4M 包埋的样品制备主要过程如下：

（1）PLP或戊二醛-多聚甲醛固定液固定，0℃，2h；

（2）磷酸缓冲液含7%蔗糖，pH7.2，0℃，过夜；

（3）0.1mol/L磷酸缓冲液，pH7.2，0℃冲洗30min；

（4）30%乙醇　　0℃，0.5h；

（5）50%乙醇　　－20℃，1h；

（6）70%乙醇　　－40～－20℃，1h（之后的温度根据抗原而定）；

（7）95%乙醇　　－40～－20℃，1h；

（8）100%乙醇　　－40～－20℃，2h（中间换液一次）；

（9）K_4M∶100%乙醇 = 1∶1　　－40～－20℃，1h；

（10）K_4M∶100%乙醇 = 2∶1　　－40～－20℃，1h；

（11）K_4M（100%）　　－40～－20℃，1h；

（12）K_4M（100%）　　－40～－20℃，4～16h；

（13）把浸透好的样品置入胶囊或包埋板，常规操作；

（14）紫外线照射（12W灯管）　－40～－20℃，24h（光源与样品之间距离30～40cm）；

（15）聚合后的包埋块能在低温冰箱中长期保存（－20℃）；

（16）聚合后的胶囊移至室温再在紫外线下继续照射2～3天，可增加其硬度，便于切片。

包埋剂的配制：商品Lowicrys包埋剂由三个部分组成：单体（monomer），交联剂（crosslinker）和激活剂（initiator）。调整单体和交联剂的比例，增加交联剂的量，组织块的硬度增加。中等硬度的组织块，配制方法如下：K_4M 单体17.30g，交联剂2.70g，引发剂0.10g。

3. 免疫染色标记物与免疫染色显示

1）免疫酶细胞化学技术

免疫酶细胞化学技术（immol/lunoenzymatic technique）是用酶作为标记物显示抗

原抗体反应的，它既不改变抗原抗体的免疫反应特异性也不降低酶活性，而且必须与相应酶底物作用后形成不溶性高电子密度的反应产物。常用的酶有辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，AKP或ALP）、酸性磷酸酶（acid phosphatase，ACP）等，其中以HRP最常用，因为此酶稳定、反应特异性高，同时终末产物电子密度高。

（1）HRP标记抗体的制备：

①HRP 10mg，溶于1.25%戊二醛0.2mol/L（用0.1mol/L PB，pH6.8配制），室温放置18h；

②用生理盐水透析除去戊二醛（4℃过夜），再用生理盐水调至1ml；

③将5mg抗体溶于1ml生理盐水，与上述HRP液混合；

④速加1mol/L碳酸盐缓冲液（pH5.9）0.1ml，4℃放置24h；

⑤加0.1ml的0.2mol/L赖氨酸，室温放置2h（赖氨酸0.29g加水至10ml，即为0.2mol/L）；

⑥用半饱和硫酸铵离心2～3次，收取沉淀物，用生理盐水透析除去硫酸铵（4℃，1～2天）；

⑦离心1000r/min，30min除去大分子杂质；

⑧分装，冻干保存，或加入等量甘油PB（60%）防腐低温保存（<−4℃）；

⑨使用前用肝粉吸收非特异反应物。

说明：该方法制备的标记抗体，相对分子质量小，质量稳定，活性高，较常用。

（2）HRP标记抗体的免疫染色显示：

方法1：包埋前法（实验样品为细胞）

①免疫标记；

②2%戊二醛（0.1mol/L PB配制，pH7.2～7.4），固定2h；

③0.1mol/L PB漂洗三次，2h；

④0.5mol/L Tris缓冲液（pH7.5）漂洗2次，0.5h；

⑤室温孵育（孵育液必须新鲜配制）0.5h；

孵育液成分	
DAB	0.75mg/ml
H_2O_2	0.01%
Tris缓冲液（pH7.5）	0.05mol/L（注意避光操作）

⑥0.1mol/L PB漂洗三次，0.5h；

⑦1%锇酸（0.1mol/L PB配制，pH7.2～7.4）处理40～60min。

方法2：包埋后法（实验样品为超薄切片）

①免疫标记；

②用镊子夹持载网浸于孵育液（孵育液必须新鲜配制）中，不断搅拌液体3min；

孵育液成分	
DAB	0.1mg/ml
H_2O_2	0.0025%
Tris缓冲液（pH7.5）	0.05mol/L（注意避光操作）

③用镊子夹持载网浸于双蒸水中，不断搅拌液体30s；

④漂洗切片，用滤纸吸去多余水分并把载网捞在滤纸上，待干燥；

⑤取4%锇酸，在蜡板上滴成液滴；

⑥载网的切片一面向下漂浮在液滴表面，10～25min；

⑦彻底漂洗切片，用滤纸吸去多余水分并把载网捞在滤纸上干燥。

说明：包埋前染色的优点是：不经过锇酸固定、脱水及树脂包埋等过程，抗原未被破坏，易于获得良好的免疫反应；可在免疫反应阳性部位做定位切片，提高TEM检出率，适于含抗原量较少的样品。缺点是：由于细胞在未被很好固定的条件下经过一系列免疫染色步骤，容易出现一定程度的超微结构损伤。

2）免疫电镜胶体金标记技术

免疫电镜胶体金标记技术是利用胶体金（colloidal gold）在碱性环境中带负荷的性质，使其与抗体相吸引，而将抗体标记。它能在超微结构水平上精确、细致地定位，特异性高，对细胞微细结构损伤小，还可利用直径不同的金颗粒进行多重标记。金颗粒电子密度高，易于与其他反应产物和染色反应物质相区别（图2-7）。



图2-7　免疫胶体金标记TEM照片

EHF病毒感染Vero-E6细胞，视野内的病毒颗粒（v）和丝状包含体（IB）与胶体金发生特异结合（洪涛：流行性出血热图谱；科学出版社1988）

（1）胶体金的制备。

胶体金多用还原法制备。还原剂有柠檬酸钠、白磷（或黄磷）、鞣酸、乙醇、抗坏血酸、过氧化氢等。两种常用的方法介绍如下。

方法1：柠檬酸钠还原法

①取1ml 1%氯金酸（$HAuCl_4$）溶液加入100ml双蒸水中，加热至沸腾；

②迅速加入4ml 1%柠檬酸钠水溶液，搅拌，保持沸腾状态，5min；

③不停地搅拌直到溶液颜色出现橙红色；

④用冷水冲洗烧瓶，液体冷却后即可。

说明：这种方法制备的胶体金颗粒直径约为15nm，如将柠檬酸钠的量分别减至1.5ml、1.0ml、0.75ml，则胶体金颗粒分别增至30nm、50nm、60nm。

方法2：柠檬酸钠-单宁酸还原法

①取 1ml 1%氯金酸（$HAuCl_4$）溶液加入 100ml 双蒸水中，加热至沸腾；

②在上清液中加入 2ml 1%柠檬酸钠和 0.2mol/L 1%单宁酸水溶液，搅拌，保持沸腾状态；

③不停的搅拌直到溶液颜色出现橙红色；

④用冷水冲洗烧瓶，液体冷却后即可。

说明：这种方法制备的胶体金颗粒直径约为 5nm，增加单宁酸与柠檬酸钠的体积比，可以进一步减小胶体金颗粒直径。

注意：胶体金制备过程中污染会干扰胶体金颗粒的生成，使用绝对洁净并经过硅化的玻璃器皿；所有溶液必须用双蒸水配制；单宁酸与柠檬酸钠水溶液要现用现配。胶体金的 pH 可用 0.2mol/L K_2CO_3 或 0.1mol/L HCl 调节（可直接购买各种直径的胶体金）。

（2）金标抗体的制备。

相对分子质量大的蛋白质分子可以直接吸附于胶体金表面，相对分子质量小的肽类应先与非特异蛋白如 BSA 偶联后才能吸附，以形成蛋白质-胶体金复合物即金标抗体，其牢固而稳定吸附的基本条件是：蛋白质含很少或不含电解质，胶体金的 pH 高于蛋白质等电点 0.1～0.2（称最适 pH）。常用蛋白质的最佳 pH 如表 2-7 所示。

表 2-7　常用蛋白质的最佳 pH

蛋白质	IgG（包括单克隆抗体）	蛋白质 A	大豆凝集素	HRP	BSA-肽复合物	DNA 酶	RNA 酶
pH	9.0～9.2	5.0～6.2	6.1	7.2～8.0	4.0～4.5	6.0	9.0～9.2

方法 1：IgG-胶体金复合物的制备

①把 IgG 溶于双蒸水内，浓度大约为 1mg/ml；

②对 2mmol/L 四硼酸钠缓冲液（pH9.0）漂洗，4℃，20h，其间更换 3 次漂洗液；

③100 000×g 离心，4℃，1h，离心后取上清液；

④调胶体金 pH 到 9.0；

⑤确定稳定胶体金所需要的蛋白质量；

⑥最适蛋白质量在离心管内加入 IgG；

⑦加入 10ml 调好 pH 的胶体金；

⑧加入 1ml 10%的 BSA 水溶液，pH9.0，与上述三种试剂轻轻混匀；

⑨离心，4℃，45min；胶体金颗粒直径 15nm，60 000×g；直径 5nm，125 000×g；

⑩弃上清液，把沉淀溶于 1ml 20mmol/L Tris 缓冲液中（pH8.2，内含 1%BSA）。

方法 2：蛋白质 A-胶体金复合物的制备

①把蛋白质 A 溶于双蒸水内，浓度大约为 1mg/ml，蛋白质 A 应不含盐；

②用 0.2mol/L K_2CO_3 调胶体金 pH 到 5.9～6.2；

③确定稳定胶体金所需要的蛋白质量；

④按最适蛋白质量在离心管内加入蛋白质 A，10ml 胶体金，1ml 1%PEG，轻轻混匀；

⑤离心，4℃，45min；胶体金颗粒直径 15nm，60 000×g；直径 5nm，125 000×g；

⑥弃上清液，把沉淀溶于 1ml PB 中（内含 PEG，浓度 0.2mg/ml）。

（在蛋白质-胶体金复合物中加入 0.1%～0.01%的叠氮钠，可在 4℃保存半年以上。）

说明：之所以要确认最适蛋白质量，是因为蛋白质量太少不能使蛋白质稳定，而太

多则给纯化造成困难。

确认最适蛋白质量的方法：

a. 10 只硅化的试管，编号备用；

b. 每只试管内依次加入 0.1mol/L 经过倍比稀释的蛋白，第一管的浓度可以是 1mg/ml；

c. 每只试管内（第 10 只除外）加入 0.5ml 胶体金；

d. 每只试管内（第 10 只除外）加入 0.1mol/L 10%的 NaCl；

e. 1～2min 后观察试管内颜色的变化；

f. 第 n 管胶体金颜色由红变紫；

g. 第 $n-1$ 管的蛋白量就是稳定 0.5ml 胶体金所需要的最小蛋白量；

h. 在第 $n-1$ 管蛋白量的基础上，添加 10%，即为最适蛋白量。

（可直接购买各种金标抗体。）

3）免疫胶体金标记抗体显示

方法 1：包埋前法

如选择 IgG 为桥分子，胶体金为标记物，研究游离细胞表面抗原，其主要步骤如下：

①用 PB 漂洗，离心收集，反复 2 次；选择合适的固定液固定细胞，30min，4℃；

②弃去多余固定液，加入 0.5mol/L NH_2Cl（0.1mol/L PB 缓冲），30min，4℃；

③0.1mol/L PB 漂洗，30min，4℃，其间换液 2 次；

④1%BSA（牛血清白蛋白，溶于 0.1mol/L PB）20min，室温；

⑤特异抗血清，用含 1%BSA 的 0.1mol/L PB 稀释至适当浓度，室温 1h 或 4℃过夜；

⑥室温下 0.1mol/L PB 漂洗 10min；20mmol/L Tris 缓冲液（pH8.2，内含 1% BSA）10min；

⑦IgG-胶体金复合物，用 20mmol/L Tris 缓冲液稀释 20 倍，1h，室温；

⑧20mmol/L Tris 缓冲液（pH8.2，内含 1%BSA）10min；

⑨1%锇酸（0.1mol/L PB 配制），1h，室温；

⑩常规脱水和环氧树脂包埋。

说明：如果用于组织或细胞内部抗原的研究，在固定后首先制成 20～40μm 的厚切片，再按上述方法制备。

方法 2：包埋后法

①选择合适的固定液固定样品，30min，4℃；

②0.5mol/L NH_2Cl（0.1mol/L PB 缓冲），2h，4℃；

③0.1mol/L PB 漂洗，2h 或过夜，4℃，其间换液 2 次后脱水和包埋；

④室温下将超薄切片捞于镍网或不锈钢网上，不带支持膜或碳膜加固；然后将切片面向下漂浮在 1%BSA（溶于 0.1mol/L PB）液滴上 5min；然后夹持载网入特异抗体；

⑤抗体经 0.1mol/L PB（含 1%BSA）稀释至适当浓度，室温 1～2h 或 4℃过夜；

⑥0.1mol/L PB 漂洗，10min，室温；20mmol/L Tris 缓冲液（pH8.2，内含 1% BSA）10min；

⑦IgG-胶体金复合物，用20mmol/L Tris缓冲液漂洗，10min，室温；

⑧20mmol/L Tris缓冲液（pH8.2，内含1%BSA）10min；

⑨双蒸水漂洗10min；

⑩切片干燥0.5h后，柠檬酸铅和乙酸铀染色。

说明：在免疫细胞化学处理全过程中，应保持载网面湿润，否则会影响抗体活性。漂洗是一个关键，每步都要洗彻底，以减少样品非特异性吸附。如果使用低温包埋剂，切片在免疫标记之前不需要其他处理；若使用环氧树脂包埋，在免疫标记之前，切片需要用1%～10%H_2O_2处理，视环氧树脂硬度和切片厚度而定，越硬需H_2O_2浓度越高，以除去锇酸和增进树脂的穿透性，利于抗体进入。双蒸水洗3次，每次5～10min，TBS（pH7.4，Tris-HCl缓冲液）洗2次，每次5min。

另外，环氧树脂包埋的样品，常规染色；低温包埋样品的染色稍有差别：

a. 3%乙酸铀水溶液染5min，水洗，时间不宜过长；

b. 乙酸铅染色约45s，水洗，时间不宜过长。

【对照实验】

设对照实验的目的是确定免疫特异性，排除非特异性结合的可能，同时，帮助确定非特异性结合的来源，以利消除。常用三种方法，可选择其中一两种，与正式实验平行进行。

（1）吸收实验：用过量的特异性抗原吸收相应的第一抗体，然后用吸收后的抗血清作第一抗体孵育切片，结果应为阴性。操作方法：取10～50μg抗原加入稀释的抗血清中，置4℃冰箱中过夜，次日离心（3000r/min）15min，取上清液孵育切片。

（2）置换实验：用正常动物血清（动物种属应与一抗一致）代替特异性一抗血清进行孵育，也可用PBS代替，结果应为阴性。

（3）阻断实验：即封闭实验。操作方法：先用未标记的抗体孵育切片，使其预先与组织中特异性抗原决定簇结合，此时加入已标记的特异性抗血清，由于抗原决定簇已被结合而不会再显示免疫反应，结果为阴性。

2.2.4 石蜡组织与石蜡切片的TEM样品制备

在科学研究中常常会遇到对石蜡组织和切片进行TEM水平的观察问题，这样必须把石蜡组织或石蜡切片制备成超薄切片，以在TEM下观察，是超微病理学研究的一种非常有用的基本技术。

1. 石蜡组织块制备TEM超薄切片的方法

（1）确认石蜡组织块中需要研究的区域，将其切成$1mm^3$小块；

（2）二甲苯脱蜡，4h至过夜，室温（或2h，40℃）；

（3）水化：

①100%丙酮，30min（换液2次），室温；

②90%丙酮，5min，室温；

③70%丙酮，5min，室温；

④50%丙酮，5min，室温；

⑤30%丙酮，5min，室温；

⑥0.1mol/L 磷酸钠缓冲液，1h，室温；

(4) 1%四氧化锇，1h，25℃；

(5) 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液，30min（换液 2 次），室温；

(6) 脱水、浸泡、包埋、聚合、超薄切片和电子染色均按常规方法制备。

2. 石蜡切片制备 TEM 超薄切片的方法

(1) 确认石蜡切片上要研究的区域，用金刚石笔在切片的背面做好标记；

(2) 把切片置于二甲苯溶液中，直到脱掉盖玻片和封闭树脂；

(3) 参考上述方法对切片（在载玻片上）进行水化；

(4) 1%四氧化锇，30min，室温；

(5) 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液，30min，室温；

(6) 常规方法脱水；

(7) 在标记区域滴加包埋液浸泡，用内径约 2mm 的塑料管准确套在标记区域上；

(8) 在小管内注满包埋液后，将载玻片放进 80℃烤箱聚合 30h；

(9) 冷却载玻片，用手术刀把塑料管和载玻片分离，塑料管的分离面即原切片面；

(10) 塑料管的切片面朝上插入半空的包埋块胶囊，添加一些包埋液再次加温聚合，把塑料管固定在胶囊中。之后，便可以按常规方法完成超薄切片。

2.3　扫描电子显微镜

扫描电子显微镜（scanning electron microscope，SEM）适于观察研究组织、细胞表面或断裂面的三维立体结构。配合适当的样品制备技术或者分析技术，可以在超微结构水平上对组织、细胞表面或断裂面的成分进行定性定量的综合分析。一般生物医学 SEM 的分辨本领为 3～10nm，放大倍数为 3～300 000×，加速电压为 1～30kV（图 2-8）。

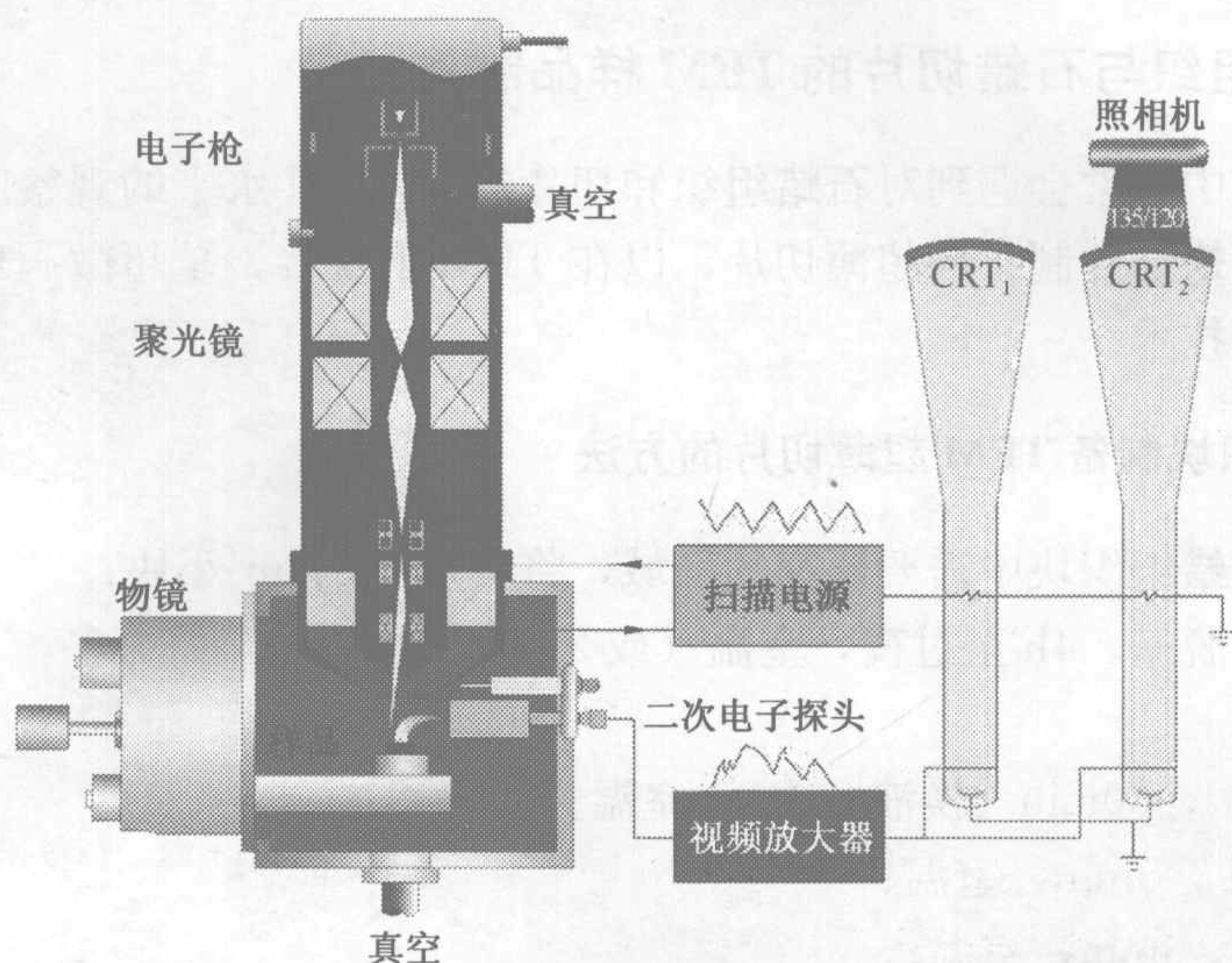


图 2-8　扫描电镜示意图（李伯勤提供）

【实验原理】

SEM由电子光学系统（镜筒）、扫描系统、信号检测及显示系统、供电系统、真空系统五部分组成。其中，镜筒是由电子枪、几级电磁透镜和样品室组成的。在SEM镜筒中所有电磁透镜均位于样品上方，主要起聚焦电子束的作用，而且一直工作在聚焦状态（TEM一般工作在散焦状态），形成的电子束比TEM细三个数量级，可达3～10nm或更细，所以，有“探针”之称。扫描系统控制“探针”在样品表面逐点逐行地扫描，逐点逐行地发生电子散射，二次电子①逐点逐行地从样品表面逸出。在适当控制其他变量（加速电压等），同时制备样品使其“质量—厚度”② （ρt）具有一致性的条件下，可以使样品二次电子逸出率仅仅取决于样品表面形貌参数（入射角θ③）。通过二次电子检测及显示系统，使镜筒内样品上每一点的二次电子信号强弱与CRT上相应的每一点像素的亮度变化一致。那么，在扫描系统的控制下，“探针”在样品上的扫描与CRT电子束的扫描完全同步，样品上每一点的二次电子数量都对应着CRT上一个像素的亮度，二次电子信号强，像素则亮；反之，则暗。CRT上呈现出样品表面形貌的二次电子显微像。

【实验用品】

（1）一台性能良好的扫描电子显微镜。

（2）制备好的SEM生物医学样品，用导电胶黏在样品托上。

【方法与步骤】

扫描电镜的基本操作程序（适用于大多数医学SEM正常工作条件下操作）

（1）开电源，待镜筒真空达到最佳状态后（一般优于10^{-5}torr）开始工作。

（2）据样品情况，选择合适的加速电压，使阴极加热并达到饱和点。

（3）放入待测样品，核对电子光路工作状态，必要时进行消像散等操作。

（4）根据样品情况，选择合适的加速电压。

（5）从低倍率到高倍率检查样品结构，发现或选择感兴趣的观察区域。

（6）根据观察区域的样品结构，选择合适的“工作距离”，进行图像粗聚焦及其他校正补偿操作，确认拍照区域并移动到荧光屏中心。

（7）根据拍照区域的样品结构，选择合适的放大倍数，进一步细致聚焦与消像散。

（8）操作拍照记录系统。

（9）关机操作。

【结果与分析】

（1）扫描电镜常用来观察空腔器官游离表面的超微结构变化，以获得生动的三维成像。但由于普通SEM的分辨能力较低，应注重结合TEM观察结果进行综合分析。

（2）游离细胞（包括血细胞、尿细胞、卵细胞、精子细胞、胸腹水细胞及各种脱落细胞，培养细胞等）表面的超微结构变化可以使用SEM观察；若要研究其细胞器的超

---

① 也可以是背散射电子、吸收电子等信号。这些信号是在入射电子与样品作用，发生电子散射过程中产生的。它们的产率与样品元素、入射角θ、加速电压等均有关。

② “质量—厚度”是描述样品性质的物理量，在SEM中，等于一微细结构点的密度ρ（μg / cm^3）乘以入射电子束通过该点的扩散深度t_{se}，单位是μg / cm^2，常记为ρt。

③ θ角为入射电子束与样品上被作用区所在平面的法线之间的夹角。

微结构变化，则必须同时做 TEM 超薄切片的观察。

2.4 SEM 样品制备

SEM 生物样品制备技术是 20 世纪 60 年代以后发展起来的。在二次电子表面形貌成像状态下，任何 SEM 生物样品制备方法获得的样品，都必须满足下述基本要求：样品的被观察面应充分的暴露出来（在所要求的二次电子图像分辨率水平上），无污染、无皱缩、无明显的人工损伤及附加结构；镀一层均匀的重金属导电材料（金、铂、钯铱合金等），造成被观察表面的"质量—厚度"一致性；"厚度"既要≥入射电子束进入样品的扩散深度"t_{se}"，又不能掩盖样品本身的凹凸形貌结构。同时，样品表面的二次电子发射率要高；样品与样品托之间导电性要好；能耐受高能量的入射电子束和高真空，不变形、不升华。

由于观察目的不同，除了使用相同的固定液之外，SEM 生物样品制备与 TEM 有较大的差异。为了得到无损、真实而清晰的表面形貌结构，在 SEM 样品制备的全过程中都必须十分小心地保护被观察面。取材时，针对不同的样品、不同的观察要求，采取不同的技术，使被观察表面充分地暴露出来；脱水时，为了避免观察表面皱缩变形，设计了特殊的干燥方法；同时，还必须对样品进行导电处理，在样品表面喷镀一层厚度适当、均匀的金属膜。

2.4.1 常规 SEM 生物样品制备

【实验用品】

（1）试剂：0.25%～1%低浓度戊二醛、2.5%的戊二醛、1%锇酸溶液、0.1mol/L 的 PB（pH7.2～7.4，37℃，渗透压 310mOsm/L）、丙酮、无水乙醇、乙酸异戊酯、液态二氧化碳、双蒸水、抛光膏。

（2）器材：临界点干燥器、离子溅射仪、电吹风、样品托、样品篮、银导电胶、吸管、剪刀、手术刀、刀片、注射器。

【方法与步骤】

1. 准备样品托

（1）用抛光膏擦净样品托；

（2）用丙酮洗净抛光膏；

（3）用乙醇漂洗，电吹风机吹干备用。

2. 取材

将小白鼠断颈处死，迅速暴露其主动脉血管，用剪刀取下 1cm 左右，刀片剖开，暴露内皮表面。

注意：确认取材位置，避免误取，刀片要锋利，操作须快捷，保护被观察的内皮自然表面完好无损；样品体积一般为 3～5mm^3，也可以根据样品托大小等而定，但为了提高样品的固定、脱水、干燥和镀膜等制备效果，样品的体积应尽可能小一些。

3. 漂洗

用注射器吸取0.1mol/L PB沿血管固有皱折的方向冲洗，将血渍洗净，必要时可用振荡法清洗。

说明：通过漂洗，清除样品被观察表面的污物和杂质，使之在所要求的图像分辨率水平上充分被暴露出来，是SEM观察并获得正确结果的充要条件，以最短的时间、最彻底的清洗和操作过程无损伤为漂洗的原则。为了达到彻底漂洗干净的目的，尚有多种物理和化学的漂洗方法，如振荡法、加压冲洗法、离心法、超声法、灌流冲洗法、酶解法与酸碱腐蚀法等，应根据样品需要合理选择。

4. 固定

5. 漂洗

弃去固定液，用缓冲液清洗3次，10min/次；然后再用双蒸水漂洗1次，10min。

6. 固定

将血管内皮放在1%锇酸溶液中，4℃冰箱下固定1h。

7. 漂洗

弃去固定液，用缓冲液清洗3次，10min/次。

8. 脱水

依次用30%，50%，70%，80%，90%，100%（两次）丙酮溶液脱水，10min/次。

注意：在梯度脱水过程中，严格防止被观察的表面暴露在空气中，以免样品皱缩变形。

9. 用乙酸异戊酯置换丙酮

(1) 弃去乙醇，用乙酸异戊酯与100%乙醇1∶1混合液浸10～20min；

(2) 弃去混合液进入纯乙酸异戊酯，浸10～20min，其间换液一次。

说明：虽然丙酮能与CO_2互溶，可丙酮挥发太快，操作稍慢就会使CO_2完全挥发，以至造成丙酮-CO_2干燥，所以利用乙酸异戊酯与CO_2互溶挥发较慢的特点，先置换丙酮再作为“中间液”与CO_2互溶，以达到更好的临界点干燥效果。

10. CO_2置换乙酸异戊酯及临界点干燥

临界点干燥是利用水和气的临界状态下表面张力为零的特性，使样品中的液体气化而干燥，避免了表面张力对结构的破坏。

(1) 从纯乙酸异戊酯中取出样品；

(2) 保持湿的浸润状态置入临界点干燥仪（critical point dryer）的样品篮（样品篮

的上下两面事先铺好滤纸)；

(3) 在保证样品被乙酸异戊酯浸润的情况下，把载有样品的样品篮放进样品室（预先冷却临界点干燥器的样品室，使其温度降到0℃)；

(4) 盖紧样品室盖；

(5) 打开进气阀门，充入液体CO_2，使之达到样品室容积的70%～80%，随即关闭液体CO_2钢瓶和进气阀门；

(6) 样品室的温度控制在5℃以下，压力60kg/cm^{2}左右，持续5～10min；

(7) 使样品室温度升至40℃，打开进气阀门，缓缓放出气体CO_2（100～500ml)；

(8) 重复充液排气2～3次，使液态CO_2置换出样品中的乙酸异戊酯；

(9) 当气压下降到30kg/cm^{2}以下时，切断加热器；

(10) 样品室温度降到室温，压力降到零以后，打开样品室盖，取出被干燥的样品，放入干燥器内备用。

注意：保证样品室的清洁；样品放入样品室之前，要预冷。具体操作：打开进气阀门，充入液体CO_2，3～5s，反复数次，直至使其温度降到0℃；排放气体CO_2一定要缓慢，否则样品室压力急剧下降容易造成样品损伤。

11. 粘贴样品

(1) 从样品篮中取出血管内皮，确认被观察的内皮自然表面向上并防止污染或损伤；

(2) 用少量银导电胶涂在样品托上；

(3) 用镊子轻夹样品侧面，待观察面朝上粘贴于样品托上；

(4) 用银导电胶将样品粘固于样品托，待导电胶干燥备用。

12. 离子溅射镀膜

(1) 把样品托插入离子溅射仪真空室样品台上；

(2) 抽真空，当达到一定的真空度后（根据所用的金属靶的要求)，加高压；

(3) 操作离子溅射镀膜装置，可看到紫色辉光放电；

(4) 在电极之间的电压、样品与金属靶之间的距离确定时，通过控制溅射时间掌握镀膜厚度，获得连续的一层10～15nm厚的金属膜；

(5) 结束溅射镀膜，关闭高压；

(6) 离子溅射仪真空室进气；

(7) 取出样品待SEM观察。

说明：高能粒子轰击金属靶（金、铂、钯铱合金等)，靶金属原子获能后由靶表面逸出而沉积在样品表面，形成的金属膜不仅使生物样品导电、受激后产生强二次电子发射，而且还能在不掩盖样品形貌结构的条件下，使样品表面获得了“质量一厚度”的一致性。为此，操作中必须控制好相关参数，以获得清晰而真实的二次电子表面形貌成像效果。

2.4.2 SEM游离细胞制备

游离细胞是指非实体组织的细胞，单个分散存在，如血细胞、尿细胞、卵细胞、精

子细胞、胸腹水细胞等。培养细胞虽然不都是分散细胞，但标本制备原则与游离细胞相似。

【实验原理】

制备游离细胞SEM标本，存在一些共性的问题。例如，细胞悬浮于体液中，使它们聚集必须经过离心，但离心力会损伤细胞，尤其细胞的表面结构，所以在离心前最好预固定；游离细胞固定时，也会把体液中的蛋白质与杂质一同固定，而这些非结构小块会遮盖细胞表面细微结构，因此必须经过充分冲洗；游离细胞在脱水、干燥等操作过程中容易丢失，必须使细胞附着在一个表面上进行操作；由于血细胞或胸、腹水细胞等在取出时经过挤压或穿刺针的细孔而变形，故必须设法使细胞于固定前恢复为原来形状，才能用SEM看到真实的形态结构。现以红细胞为例说明游离细胞扫描电镜标本制备的方法与过程。

【实验用品】

（1）试剂：0.25%～1%低浓度戊二醛、2.5%戊二醛、1%锇酸、0.1mol/L的PB（pH7.2～7.4，37℃，渗透压310mOsm/L）、多聚赖氨酸、丙酮、无水乙醇、乙酸异戊酯、液态二氧化碳、双蒸水。

（2）器材：临界点干燥器、烘箱、离子溅射仪、离心机、离心管、样品托、样品篮、银导电胶、吸管、滴管、玻片、滤纸、眼科镊子。

【方法与步骤】

1. 取材

取一滴手指静脉血，放入0.1mol/L的PB（pH7.2～7.4，37℃，渗透压310mOsm/L），温育15～20min。

2. 预固定

加入浓度为0.25%的戊二醛，15min，使红细胞保持体内的形状。胸、腹水细胞等其他体液细胞的制备与上述类似，如制备血小板样品时则需先加枸橼酸钠或肝素抗凝。

3. 离心

用低浓度戊二醛（0.25%～1%）使细胞初固定，离心时不至造成细胞损伤，但离心力不能过大，时间不能过长，根据细胞大小，选择离心速度，如红细胞为900～1100r/min，8min；血小板为1500r/min，10min。

4. 固定

离心后弃去上清液，在细胞沉淀中加入2.5%的戊二醛，用吸管轻轻吹打，使细胞分散。于室温下再固定30min。漂洗后用1%锇酸固定5～15min 。经过戊二醛两次固定、锇酸再固定后可以收到很好的固定效果。

培养细胞的样品制备原则也是先预固定，再集中离心。具体做法是在培养液加入戊二醛，15min后，用细胞刮取出细胞离心。

5. 漂洗

漂洗的目的是除去固定液，将细胞团块分散成一个个散在的细胞，同时把经固定后液体中的小蛋白质凝块洗去，使这些小凝块脱离细胞表面，以免遮盖细胞表面超微结构。

注意：清洗所用的双蒸水必须十分清洁，最好预先经微孔滤膜过滤，以除去水中的细菌及颗粒杂质。不用缓冲液或先使用缓冲液再用水洗，因缓冲液中的盐可能在脱水时析出并粘在细胞表面，污染样品。漂洗时用力要适度，多次吹打样品。每步换液都要更换吸管，防止交叉污染。

6. 样品附着

由于多次离心使细胞丢失，因此最好先将细胞附着在玻片或塑料片表面，使细胞随同该玻片或塑料片一起脱水、干燥。

(1) 制备 0.1%多聚 L-赖氨酸膜：将 1mg 多聚赖氨酸溶于 1ml 过滤后的双蒸水中；

(2) 清洗玻片（或塑料片）；

(3) 把 0.1%多聚 L-赖氨酸滴在洗净的玻片上；

(4) 待液滴展开后在 45℃烘箱中干燥。因为多聚 L-赖氨酸带正电荷，能使较多的表面带负电荷的细胞附着。

(5) 将固定与清洗后的细胞用过滤后的水制成浓度适宜的细胞悬液，悬滴在已铺好膜的玻片或塑料片上，在湿润、低温（4℃）环境中放置 30min 左右，使细胞附着到膜上。

7. 脱水

用细镊子夹起玻片在清洁的双蒸水中振荡，洗去未附着的细胞，然后迅速进入丙酮的系列脱水。每步脱水时间约为 3min。

8. 黏托和镀膜

临界点干燥后将玻片或塑料片用导电胶黏于样品托上进行金属镀膜（图 2-9）。

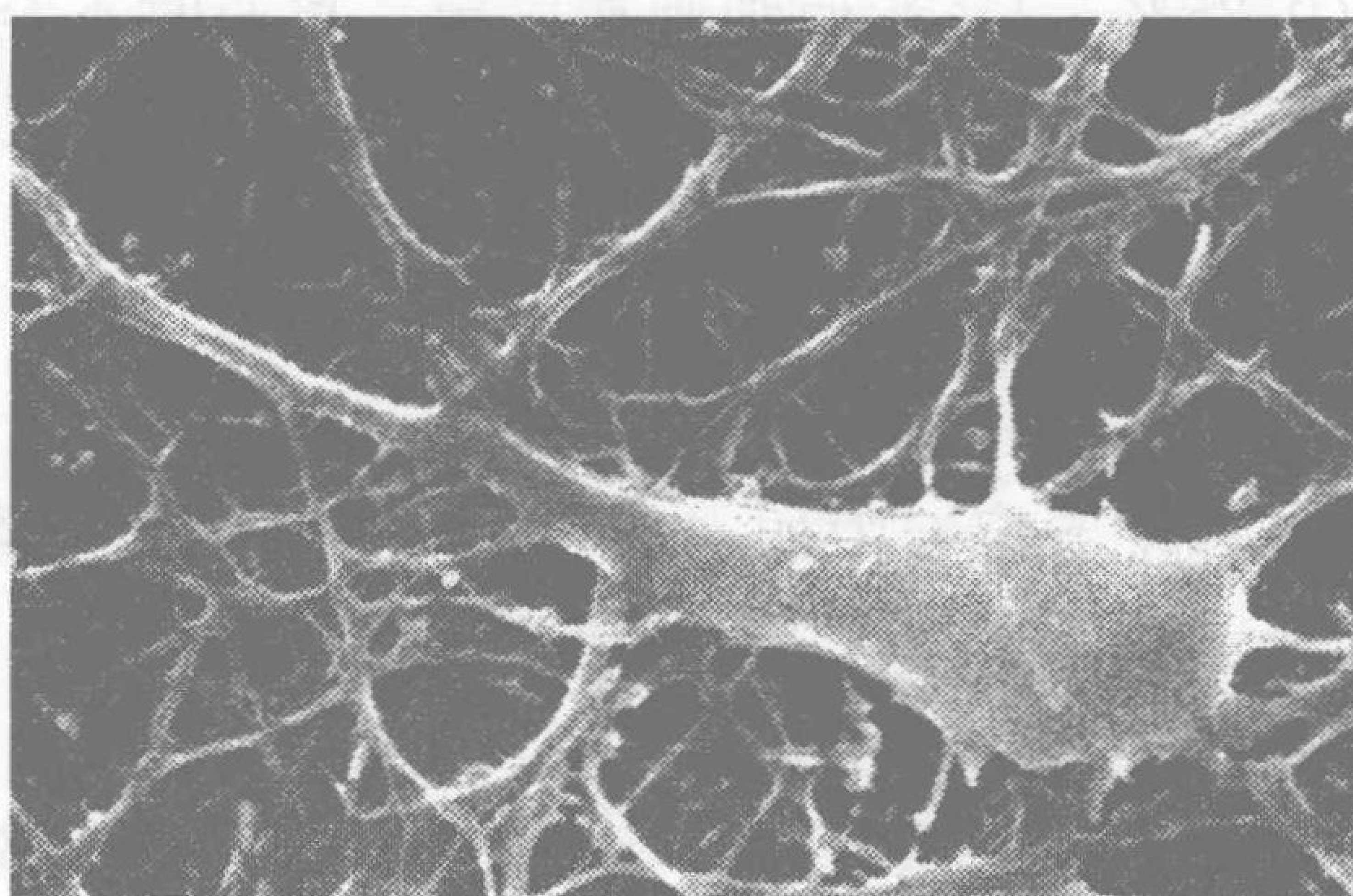


图 2-9 大鼠原代培养神经元 SEM 照片（李伯勤提供）

2.4.3 SEM免疫细胞化学技术

SEM免疫细胞化学技术（immol/lunocytochemistry under scanning electron microscope），相对TEM免疫细胞化学技术简单得多，而且能在三维空间大面积地观察标记物分布（图2-10）。

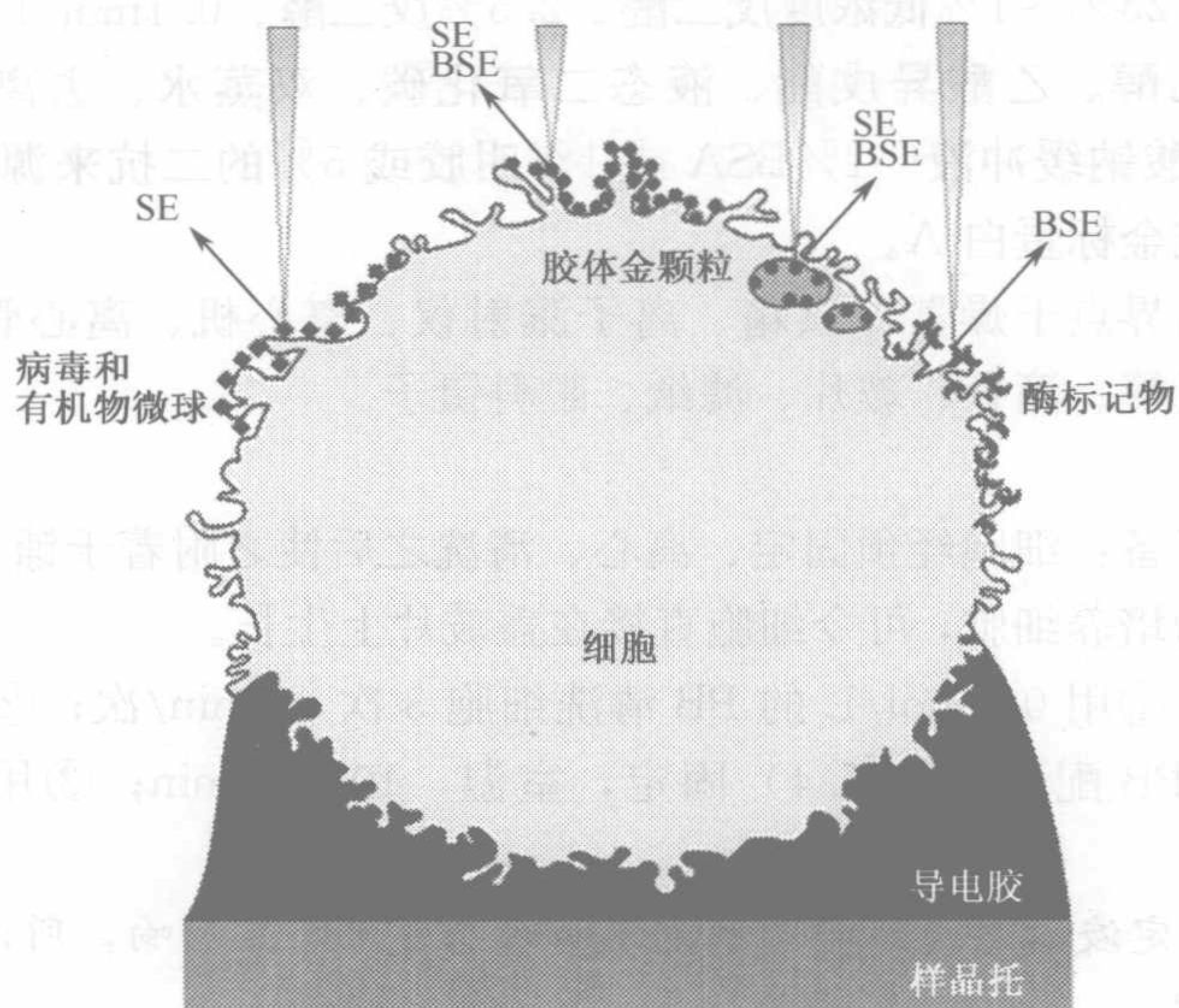


图2-10 SEM免疫细胞化学示意图（李伯勤提供）

【实验原理】

SEM免疫细胞化学技术的原理，同样是通过标记物检测抗原-抗体反应，以确定某一特定化学物质在细胞表面或断裂表面的位置。其关键在于选择合适的标记物并选择与之相适应SEM信号。

SEM免疫细胞化学标记物的特点：具有特征性的形态、易与样品表面的结构相区别；能够大量的收集和制备，以供反复实验使用；结构稳定，不宜破坏。标记物的大小必须合适：与观察样品相适应。目前，许多研究者应用的标记物和与之适应的成像信号，一般可分为三种。

第一种是使用病毒和有机物微球做标记物，如烟草花叶病毒、T_4噬菌体、SV-40、聚酯乳胶微球、市售商品聚苯乙烯类小球等，颗粒大小均匀一致，常用颗粒直径0.08～90μm。当使用这一类标记物时，SEM应采用二次电子作为成像信号。

第二种是使用含重金属元素的颗粒性标记物，如胶体金颗粒、铁蛋白等。金颗粒作为扫描电镜的标记物，其大小一般为40～80nm，由于金二次电子发射率高，只要样品上没有覆盖金属膜，就可以看到金颗粒发出亮光，容易识别。铁蛋白在SEM中应用较少。当使用这一类标记物时，SEM既可以采用二次电子作为成像信号，也可以采用背散射电子作为成像信号。由于背散射电子能量高，所以可用来观察那些位于样品表面之下的标记物，如胞饮小泡中的标记物。

第三种是使用酶做标记物，如HRP等。仍然要把酶反应产物变成含有重金属的

沉淀，如锇酸。在 SEM 中，通过收集这些重金属元素的背散射电子信号来确定酶的位置，并由此定位抗原。所以，使用酶标记物时要求 SEM 必须备有背散射电子成像。

现以游离细胞为例说明样品的制备过程。

【实验用品】

(1) 试剂：0.25%～1%低浓度戊二醛、2.5%戊二醛、0.1mol/L 的 PB、多聚赖氨酸、丙酮、无水乙醇、乙酸异戊酯、液态二氧化碳、双蒸水、去离子水、1%锇酸、0.1mol/L 二甲胂酸钠缓冲液、1%BSA 或 1%明胶或 5%的二抗来源物种的正常血清、一抗、金标二抗或金标蛋白 A。

(2) 器材：临界点干燥器、烘箱、离子溅射仪、离心机、离心管、样品托、样品篮、银导电胶、吸管、滴管、玻片、滤纸、眼科镊子。

【方法与步骤】

(1) 细胞的准备：细胞经预固定、离心、清洗之后使之附着于铺有多聚赖氨酸膜的盖玻片上。如果为培养细胞，可令细胞直接在盖玻片上生长。

(2) 预固定：①用 0.1mol/L 的 PB 清洗细胞 3 次，5min/次；②用 0.25%戊二醛（由 0.1mol/L 的 PB 配制，pH7.4）固定，室温，10～30min；③用 0.1mol/L 的 PB 冲洗。

注意：由于固定液的渗透压会对细胞表面形态发生明显影响，所以必须认真调整。

(3) 免疫标记：

①1%BSA 或 1%明胶或 5%的二抗来源物种的正常血清，孵育 10min，室温，阻断非特异结合；

②一抗，室温，1h 或 4℃过夜。操作：将约 100μl 的抗体滴于蜡片上，将盖片带细胞的一侧向下，漂浮于抗体表面。盖片反面应事先用滤纸吸干。以下每一步骤均采用这种操作方法；

③0.1mol/L PB 洗三次，每次 5min；

④金标二抗或金标蛋白 A，室温，1h；

⑤用 0.1mol/L 的 PB 洗三次，每次 5min。

(4) 2%～2.5%戊二醛-PB 再固定，室温 10min。

(5) 漂洗：0.1mol/L 的 PB 洗三次，每次 5min。

(6) 1%锇酸（由 0.1mol/L 二甲胂酸钠缓冲液配制，pH7.4）4℃，固定5～15min。

(7) 漂洗：去离子水漂洗 3 次，10min/次。

(8) 常规 SEM 系列脱水，临界点干燥。

(9) 导电处理：和常规 SEM 方法一样，样品应经导电处理，其处理方法随观察信号而异。现以胶体金标记物为例说明：

①镀金或铂。用于观察二次电子信号，要特别注意金属镀层不宜太厚，否则胶体金颗粒将难以辨认。为了同时看清细胞表面与胶体金的二次电子像，观察时最好用低加速电压（2～5kV）。

②喷碳。用于观察背散射电子像。此时信号强弱仅与原子序数有关，因此胶体金颗粒显示为在暗背景下的亮点。当金颗粒直径为 10～20nm 时，放大倍数应在 2～4

万倍。

（李伯勤）

参考文献

程时，彭学敏．1997．生物医学电子显微技术．北京：北京医科大学与中国协和医科大学联合出版社

李伯勤，张圣明．2003．医学超微结构基础．济南：山东科学技术出版社

Johannessen J V，Hashimoto K L 1985. Electron Microscopy in Human Medicine-Special Techniques and Applications. Volume 11(b). Mc Graw-Hill International Book Company

第3章　细胞化学技术

细胞化学（cytochemistry）或组织化学（histochemistry）是生命科学和医学研究以及临床诊断中不可缺少的重要的技术手段，是一门在保持组织、细胞原有生活结构状态及化学成分的基础上，利用物理学、化学、免疫学、分子生物学等原理与技术，对组织与细胞内的化学成分及其变化规律进行定性、定位、定量研究的科学。

这门科学最早创立于1826年，但早期的近100年进展缓慢，至20世纪30年代才逐渐发展起来。1936年创立了酶组织化学，后来随着电镜和超薄切片技术的发明及细胞生物学、免疫学、生物化学和分子生物学的迅速发展，组织化学技术手段不断丰富、创新、发展，而成为现代细胞化学。现代细胞化学包括经典的细胞化学、酶细胞化学、免疫细胞化学、荧光细胞化学、电镜细胞化学、细胞的原位杂交等。检测仪器除了光学显微镜、荧光显微镜、电子显微镜外，还可使用显微分光光度计、图像分析仪、流式细胞仪及激光共聚焦显微镜等对组织细胞内生物大分子进行更精确的定性、定位、定量研究分析。这门科学除了对组织进行研究外，对体外培养细胞、腹腔液细胞、血细胞等独立存在的细胞也可以进行研究分析。细胞化学这个概念已远远超越了早期原有的范围，无论从理论、内容、技术手段和研究范围都比过去更广泛、更深入。

利用细胞化学技术可检测动物、人等有机体的不同发育阶段、不同组织部位及异常生理、病理状态下组织细胞内结构或功能成分的表达及变化特点，从而研究个体发育过程中细胞增殖与分化，遗传与发生机制以及疾病的病因、病理诊断等，随着生命科学后基因组计划的执行，现代细胞化学已经体现出它的重要价值。

3.1　普通细胞化学

本节主要介绍细胞化学的基本理论知识、原理及技术要求，具体实验包括常用的、经典的利用化学反应原理或染料着色原理进行的核酸、蛋白质、脂类、糖类物质的显示。

3.1.1　细胞化学理论知识

【研究内容】

细胞化学的目的是研究组织细胞内的化学成分与组织、细胞形态结构及空间的关系，而且还要研究不同机能状态下某种化学成分的量或质的变化特点，包括不同发育阶段和不同的生理状况下的改变及正常与异常生理或病理条件下的差异等。其所研究的细胞内各种化学成分包括：①核酸物质（DNA、RNA）；②糖类（糖原、黏多糖、糖脂）；③脂类（中性脂肪、磷脂、固醇等）；④酶类（水解酶、氧化酶、激酶、转移酶等）；⑤蛋白质（某些特定蛋白、某些氨基酸或功能基）；⑥胺类（5-羟色胺、组胺、肾上腺素类等）；⑦特异抗原（化学本质可能是多肽、蛋白质、糖蛋白等，为强调其在功能上，

方法上的特异性和广泛应用，故列于此）⑧无机盐和微量元素（铁、铜、镁等）。

【基本要求】

要获得高质量的细胞化学标本片，一定要在标本制作处理过程中：

(1) 保存好组织细胞的结构和形态（石蜡切片要无皱褶，无破碎，冷冻切片无冰晶，切片不要太厚）；

(2) 保存好细胞内的化学成分及酶的活性（及时使用合适的固定剂或低温操作）；

(3) 显示成分的化学反应必须对将被显示的化学物质有高度特异性及高度灵敏性；

(4) 反应所生成的产物要在原位沉淀，不溶、不扩散，显色明显、颜色纯正，对比好，并在重复实验中结果一致；

(5) 反应产物有对照实验（否则难以判断其结果的可靠性）。

【基本过程及原理】

1. 常规石蜡组织切片的制备过程及原理

1）样品的取材

样品来自活体组织，取材应迅速、取材部位要准确，操作时用锋利的解剖器械，以免对细胞形态造成人为的挤压或变形。一般组织块大小约为0.5cm×0.5cm×0.3cm。

2）固定

固定是制备细胞化学标本必不可少的步骤。组织离体后会发生溶解、变形和腐败等，造成细胞结构的破坏，也就失去了制片的意义。将所取的新鲜组织块或细胞放入固定液内，借助化学药品的作用使组织细胞的形态结构保存起来，此过程即为固定。固定一方面可防止组织、细胞溶解及腐败，另一方面还使细胞内的蛋白质、脂肪、糖、酶等各种成分沉淀或凝固保存下来，保持它们原有的结构与生活状态并使得组织硬度增加、易保存、易染色等。

(1) 常用的固定剂、固定液。固定所用试剂必须具有凝固、沉淀蛋白质和脂肪等成分的作用，且渗入组织的能力要强，不使组织收缩过大或膨胀过大，常用的为乙醇、甲醇、冰乙酸、甲醛、戊二醛、丙酮、重铬酸钾、锇酸等，有些试剂单独使用会因固定作用快，容易引起收缩或膨胀，影响细胞结构，可与其他固定剂配成混合固定液，如Carnoy氏液（冰乙酸10ml，无水酒精60ml，氯仿30ml）。显示不同的化学成分常选择各自合适的固定剂，如Carnoy氏液适宜固定糖原、核酸、核蛋白，显示脂类常用甲醛固定液，而显示酶常用丙酮做固定剂。

(2) 注意事项。新鲜取材的组织要及时固定，一般取材后1min内立即固定，最好不要超过3min。固定要充分彻底，一般固定液的用量是组织块体积的30～40倍，固定时间的长短也很重要，根据所用的固定剂及所要固定物体的体积大小确定固定的时间。固定时间如果短了，细胞结构保存不好；固定时间长则会造成蛋白分子之间的过多的交联或组织结构变脆，影响后面的染色。例如，Carnoy氏液穿透力大，固定组织块（0.5cm×0.5cm×0.2cm）需30～50min，一般细胞涂片或爬片等单层细胞只需5min。

(3) 固定后漂洗。固定后组织块或细胞上常残存有固定液，如果不进行漂洗会影响后面的标本处理，造成切片不理想或染色不好，常选用与固定液相同的缓冲液进行漂洗，一般漂洗时间为30min～24h。

3）脱水、透明、浸蜡

脱水的目的是脱掉组织块内的水分，便于后面石蜡浸入组织块，一般用70%、80%、90%、95%、100%梯度乙醇逐级脱水；

透明过程常使用二甲苯，由于二甲苯既与无水乙醇互溶又与石蜡互溶，在脱水和浸蜡过程起媒介作用，将酒精置换后使石蜡能够浸入组织块内，由于二甲苯的折射率与组织蛋白质的折射率相近，可使组织透明，因此称这一过程为透明，二甲苯处理标本的时间不宜过长，否则组织易变脆，影响后面的切片。

浸蜡过程就是使熔化的石蜡浸入组织内，使其变硬易于切成薄的组织切片。应使用刚好熔化的石蜡（50～55℃），否则石蜡温度过高也会使组织变脆，切片时容易碎裂不完整。

4）包埋

包埋就是将浸好蜡的组织块包埋于石蜡中，注意包埋时的组织块定位，还要特别注意不要使组织块周围产生气泡。

5）切片与贴片

即用石蜡切片机切成约4～8μm厚度的组织切片，然后光滑面朝向载玻片贴于片上，在温水上充分展开，并在37℃烘片过夜。注意石蜡切片时，切片刀要锋利无缺口，切片要平整不要在标本处有划痕，切片不宜过厚，否则细胞层太厚结构成分不易观察清楚。

6）染色

细胞化学显色有多种方法。

（1）纯化学法：是应用最多的显示细胞内化学成分的一类方法，利用待检测物质与相应的底物发生化学反应生成有色沉淀物，然后在显微镜下进行观察研究。

（2）物理学法：最常用的是放射自显影技术，即用同位素标记化合物，使其在细胞中参与代谢，将带有标记的代谢产物通过放射自显影技术显示出来，借以探测物质代谢途径和细胞增殖周期。

（3）免疫学方法：大分子物质因具有免疫原性可获得其特异抗体，利用免疫学抗原抗体反应原理，用抗体显示相应抗原，此即免疫细胞化学。

（4）分子杂交法：它利用了分子生物学上的分子杂交原理来检测细胞内某种特定的DNA或RNA的存在及分布规律，发展为原位杂交。

（5）特异性染料吸附着色：特异性染料染色不是基于特定的反应而是特异性结合。这类方法的原理尚不清楚，或许染料通过渗透、吸附、溶解、正负静电吸引或离子键等作用与被染物质结合，从而使标本显示不同的颜色。经典的特异性染色方法已经用于显示特定的某种或某类结构成分。染料有两个特点：①有颜色；②与被染物之间有亲和力；这两个特点是由其分子结构所决定，即可产生颜色的发色团和与组织具有亲和性的助色团。发色团有：亚硝基（—NO）、硝基（$—NO_2$）、偶氮染料的—N═N—、对醌式苯环、邻醌式苯环等。助色团的作用是使化合物发生电离，与被染物质结合为盐类，如氨基（$—NH_2$）、羟基（—OH）、羧基（—COOH）、磺酸基（$—SO_3H$）、甲氨基（$—NHCH_3$）、二甲氨基[$—N(CH_3)_2$]。

如伊红中的对醌基 可吸收 490nm 蓝绿色而显红色（图 3-1），伊红的助色团为—ONa 和—COONa。

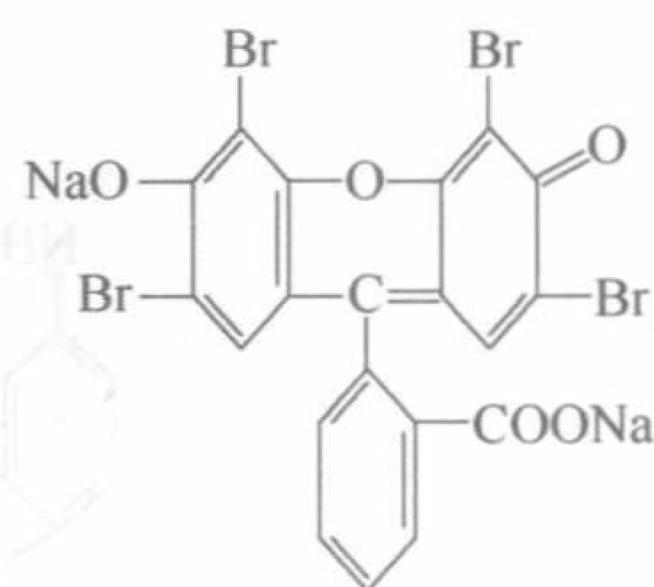


图 3-1　伊红结构式

举例说明发色团与助色团：苯为无色，当苯环中的三个氢原子为三个硝基（$—NO_2$是发色团）取代以后成为三硝基苯（黄色化合物）（图 3-2），但它不是染料，而是一个色原，因为它不能电离，不能与强碱或酸成为盐类，但若在此分子中用羟基（—OH）置换一个氢原子，则成为苦味酸，苦味酸既有发色团$—NO_2$，又有助色团—OH，可电离，与强碱形成盐，是一种黄色染料（图 3-3）。

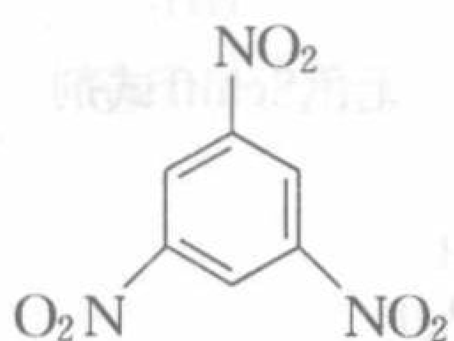


图 3-2　三硝基苯结构式

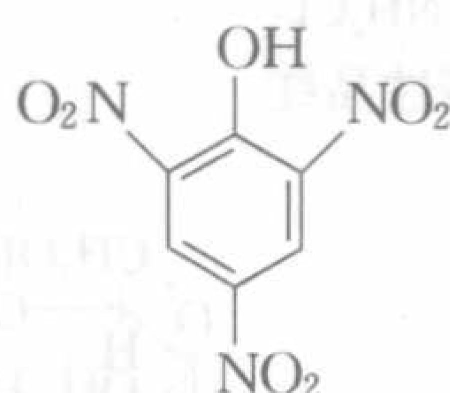


图 3-3　三硝基苯酚（即苦味酸）结构式

7）切片封固

染色后，标本片还要经过脱水后透明，再用中性树胶封固。这样的标本片可用于长期保存，并且在显微镜下清晰易观察。

石蜡切片法是最经典的生物制片法，其优点是切片薄，可作连续切片，组织显微结构显示清晰，可永久保存。但制作时间较长，某些脂溶性物质会被溶解丢失，制作过程中化学试剂或高温处理会使酶活性丧失。

2. 其他制片方法

除了石蜡切片外，冰冻切片以及根据所检测的组织或细胞材料还可以用滴片、涂片、压片、铺片、印片、爬片（体外培养的贴壁细胞，使其传代生长在盖片上，此盖片即为爬片）等。这几种制片方法都是先制片，后固定，经漂洗后可直接进入染色步骤。

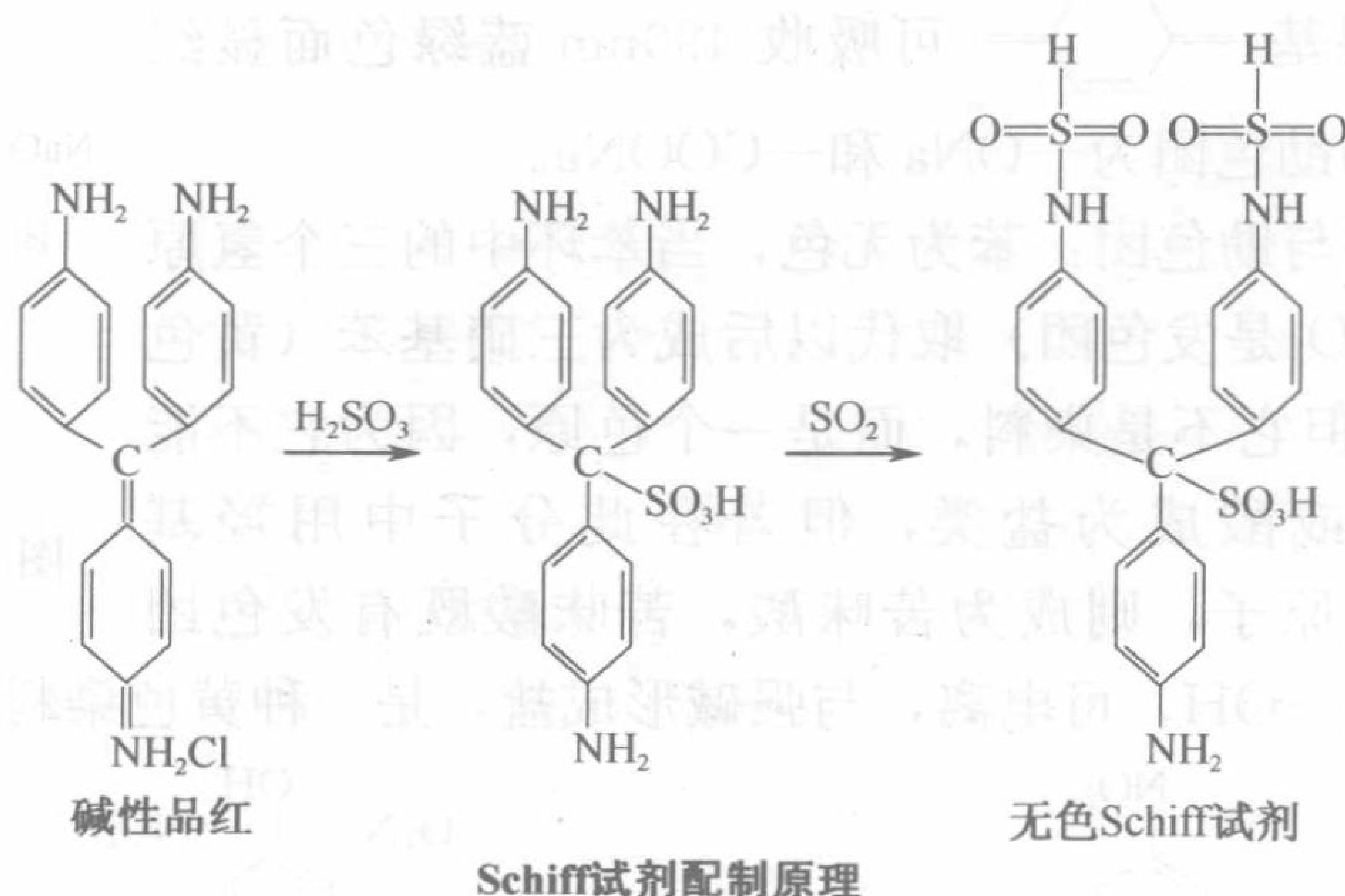
此类制作方法简单、且方便、快速，由于制备的标本片基本是单层细胞，染色效果好，省去了石蜡切片的繁琐。

（邵红莲）

3.1.2　PAS（periodic acid Schiff reaction）法显示糖原

【实验原理】

过碘酸是一种强氧化剂，能氧化将糖原中葡萄糖分子中的 2-位、3-位碳原子分开，将乙二醇基（CHOH—CHOH）变成两个游离醛基（—CHO），游离醛基与 Schiff 试剂反应产生紫红色醛染料产物。组织内的多糖、中性黏多糖及黏蛋白、糖蛋白都可用 PAS 法来显示，过碘酸同样对 CHOH—CHOH、CHOH—CHO、CHOH、$CHNH_2$等均有氧化作用而放出醛基，醛基和无色碱性品红形成紫红色产物（图 3-4）。



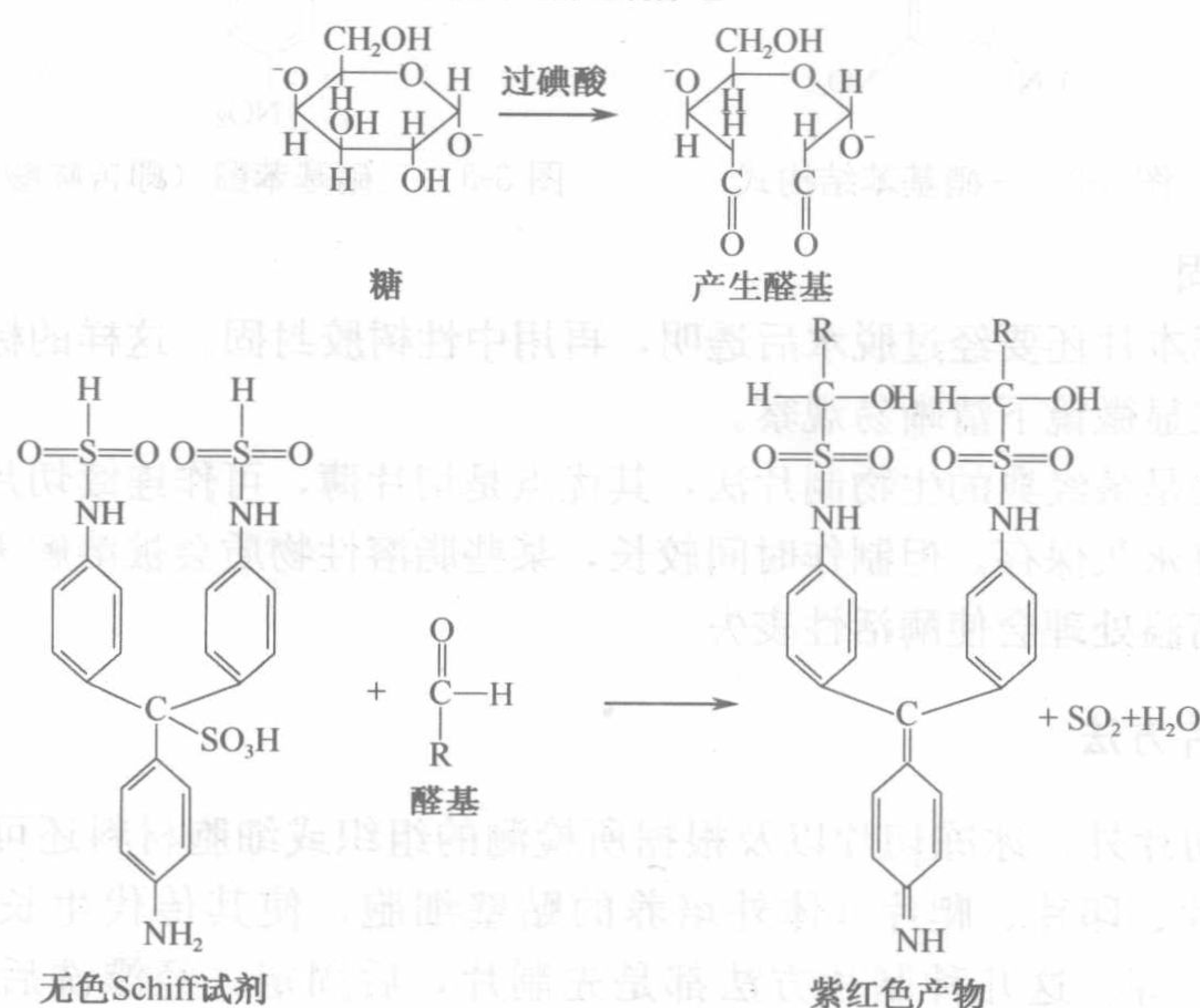


图 3-4　PAS 反应原理

【实验用品】

1. 器材

恒温蜡箱、石蜡切片机、载玻片、盖玻片、染色缸、显微镜。

2. 试剂

1）Schiff 试剂

将 0.5g 碱性品红加入 100ml 沸水中，时时摇荡玻璃瓶，煮 5min，使之充分溶解，然后冷却至 50℃时过滤，加入 10ml 的 1mol/L HCl，冷却至 25℃时加入 0.5g 偏重亚硫酸钠，在室温下静置 24h，其颜色呈褐色或淡黄色，加活性炭 0.5g 摇 1min，过滤，滤液为无色。密封，4℃保存。一般可保存数月。

2）亚硫酸水

10%偏重亚硫酸钠	10ml
1mol/L HCl	10ml
蒸馏水	180ml

3. 材料：鼠肝石蜡切片

【方法与步骤】

（1）小鼠肝石蜡切片制备

①取材与固定：颈椎脱臼法处死小鼠，打开腹腔，剪肝组织块 0.5cm×0.5cm×0.2cm，用生理盐水洗一下，立即投入 Carnoy 固定液固定 30～50min。

②洗涤脱水：依次经蒸馏水，30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%乙醇脱水各 30～40min。

③透明：二甲苯透明 30min。

④透蜡：浸入二甲苯石蜡等量混合液 20min。浸入石蜡Ⅰ，石蜡Ⅱ透蜡各 30min。

⑤包埋。

⑥切片、贴片、烤片。

（2）小鼠肝切片二甲苯脱蜡 5～10min。

（3）浸入 100%、95%、90%、80%、70%、50%等浓度乙醇各 5min，然后浸入蒸馏水 3min。

（4）浸入 0.5%过碘酸液作用 5～10min。

（5）蒸馏水洗。

（6）浸入 Schiff 试剂 15～30min。

（7）亚硫酸水洗三次，每次 2min（也可直接用自来水洗）。

（8）蒸馏水洗。

（9）50%、70%、80%、90%、95%、100%乙醇逐级脱水各 2min。

（10）二甲苯透明树胶封片。

【实验结果】

肝糖原位于细胞质中，呈紫红色颗粒状（图 3-5）。

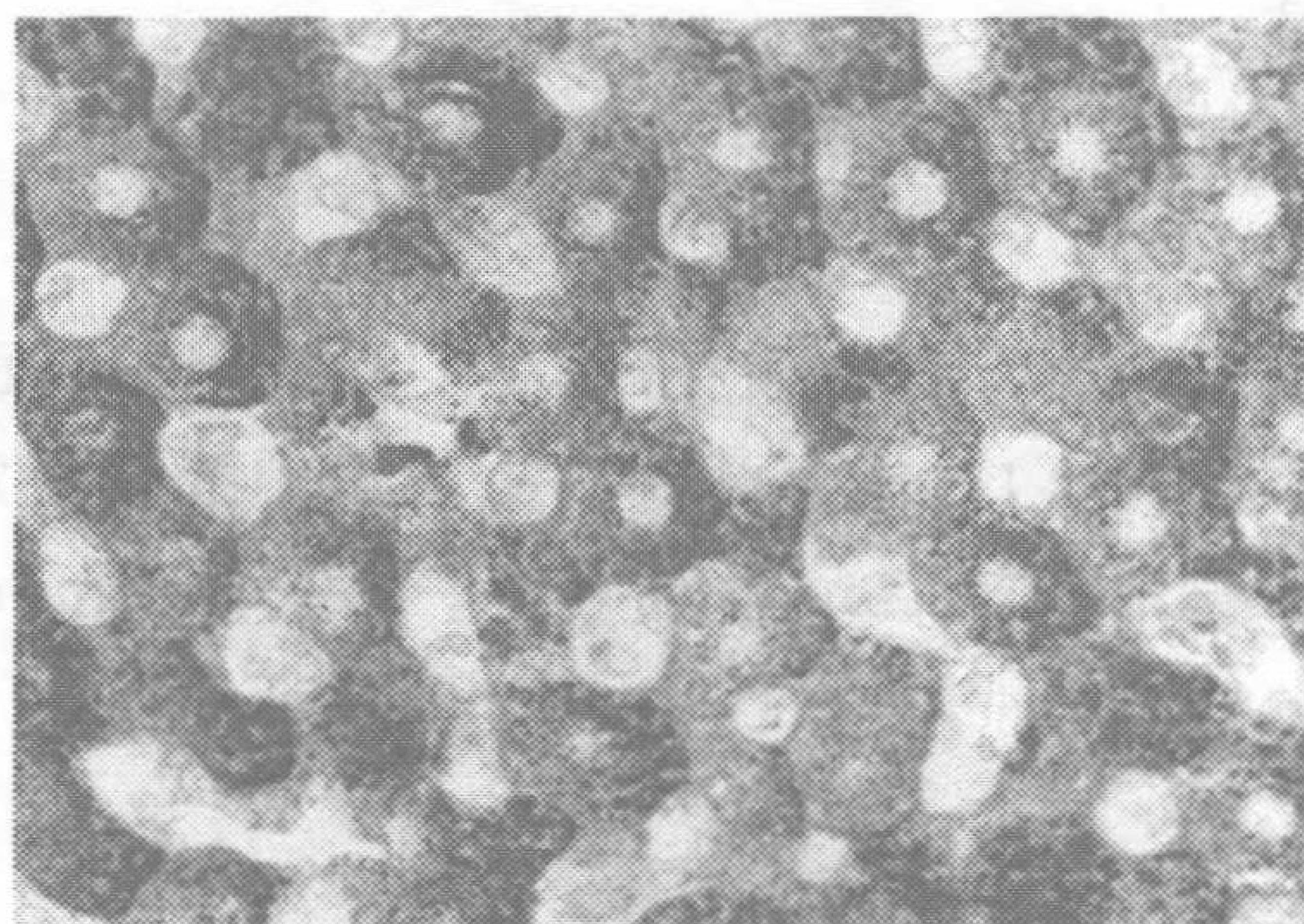


图 3-5　小鼠肝切片，PAS 反应显示细胞内糖原（糖原显示紫红色，高倍镜）

3.1.3 苏丹Ⅲ染色法显示脂类

【实验原理】

脂类分为中性脂肪、脂肪酸、胆固醇、磷脂及其他类脂质，但各种脂类与类脂质在体内多是混合存在。脂类物质不溶于水，易被酒精、氯仿、二甲苯及乙醚等溶解，故在制作标本中，除用四氧化锇固定石蜡切片外，多用冰冻切片或铺片法以保存脂类，脂类的固定多用甲醛或含甲醛的混合固定剂。脂类染料除了四氧化锇外，使用最广泛的为苏丹染料中的苏丹Ⅲ、苏丹Ⅳ（猩红）、油红O、苏丹黑及硫酸耐而蓝等脂溶性染料，脂类之所以被染色，实际上是苏丹染料被脂类溶解而显色的。

【实验用品】

1. 器材

解剖剪、眼科剪、眼科镊、载玻片、显微镜。

2. 试剂

（1）苏丹红Ⅲ染色液：苏丹红Ⅲ 1g溶入加温的70%乙醇中过滤备用。
（2）甲醛钙：甲醛10ml，乙酸钙2g，加水至100ml。

3. 材料

洋葱表皮装片或蟾蜍脂肪体压片。

【方法与步骤】

1. 洋葱表皮装片

取一擦净的载玻片，将洋葱鳞茎用小刀分为几块，取一块肉质鳞叶，用镊子在其内表面轻轻撕下一小块膜质表皮，再用剪刀剪成约3～4mm的小块，置于载玻片上铺平（内表皮面朝上），滴苏丹Ⅲ饱和染色液盖过洋葱表皮，静置5～10min，加盖片，轻压，吸出多余染液，镜下观察。

2. 蟾蜍脂肪体压片

解剖蟾蜍，在卵巢或睾丸前方有分枝花瓣状，呈黄色或表面略带灰色的脂肪体，用眼科剪刀剪一小块（小米粒大小），放在载片中央，滴甲醛钙固定液固定2min，然后换滴苏丹Ⅲ饱和染色液一小滴，静置2min，加盖片，再静置5min，轻压盖片使组织稍分散，静置5min后观察。

【观察与结果】

洋葱表皮细胞内可见许多染成橘黄色小脂滴（图3-6）。

在蟾蜍脂肪体压片视野中，有多数从脂肪细胞中分离出来的呈红色的细小脂肪滴或大脂肪滴。脂肪细胞因呈游离状态呈圆球形，内有一圆球形细胞核，细胞内充满被染为

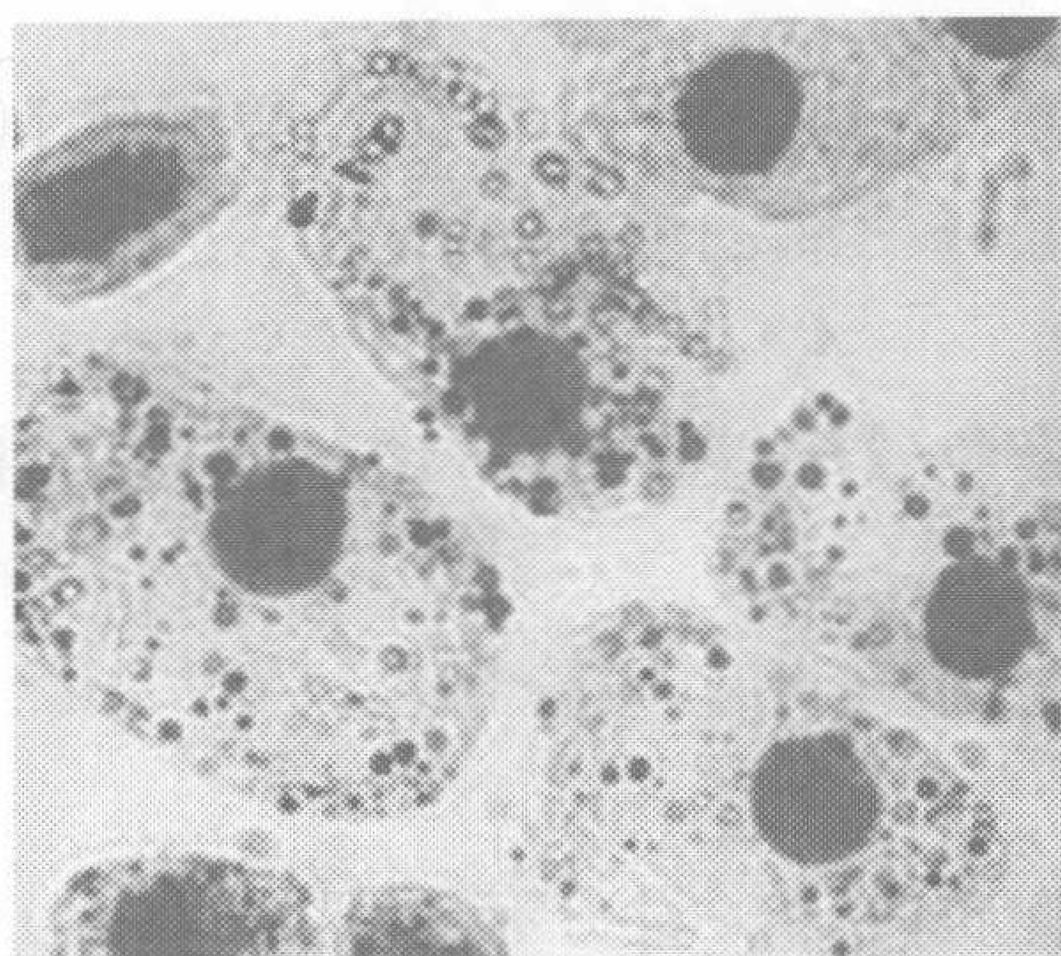


图 3-6 洋葱表皮装片，苏丹Ⅲ染色显示细胞内橘黄色脂滴

（细胞核用 Giemsa 染成紫红色）

红色的脂肪。

3.1.4 酸性蛋白与碱性蛋白的显示

【实验原理】

由于不同蛋白质分子中所带有的碱性基团和酸性基团数量不同，在不同 pH 溶液中，整个蛋白质所带静电荷多少也不同，如果在一定生理条件下，整个蛋白质带负电荷多，则为酸性蛋白；带正电荷多，则为碱性蛋白。标本经三氯乙酸处理抽提掉核酸后，核内剩下的主要是组蛋白，为碱性蛋白；细胞质内主要是酸性蛋白，用不同 pH 的快绿染液分别染色，使细胞内的酸性和碱性蛋白质显示出来。

【实验用品】

1. 器材

水浴锅、染色缸、载玻片、注射器、显微镜。

2. 试剂

（1）95%乙醇。

（2）5%三氯乙酸。

（3）0.2%快绿。

（4）0.005%Na_2CO_3。

（5）1/75mol/L HCl：盐酸 0.109ml（相对密度 1.19）加蒸馏水至 100ml（若盐酸相对密度 1.16，则取 0.13ml）。

（6）工作液。

酸性蛋白工作液：0.2%快绿和等体积 1/75mol/L HCl 混合而成。

碱性蛋白工作液：0.2%快绿和等体积 0.005%Na_2CO_3混合而成。

3. 材料

蟾蜍血涂片。

【方法与步骤】

(1) 新鲜血涂片自然干燥 10min，浸入 70%乙醇固定 10min。

(2) 取出晾干浸入 70℃ 5%三氯乙酸 20min。

(3) 蒸馏水反复洗。

(4) 分别插入工作液中染色（酸性工作液 10～15min，碱性工作液 30～60min）。

(5) 取出，蒸馏水洗。

(6) 烘干，浸入二甲苯透明 5min，树胶封片。

【结果与观察】

酸性蛋白主要分布于细胞质内，少量分布于细胞核内，故细胞质内遍布绿色，细胞核内分布少量绿色（图 3-7），碱性蛋白主要分布于细胞核中，故细胞核内遍布绿色（图 3-8）。

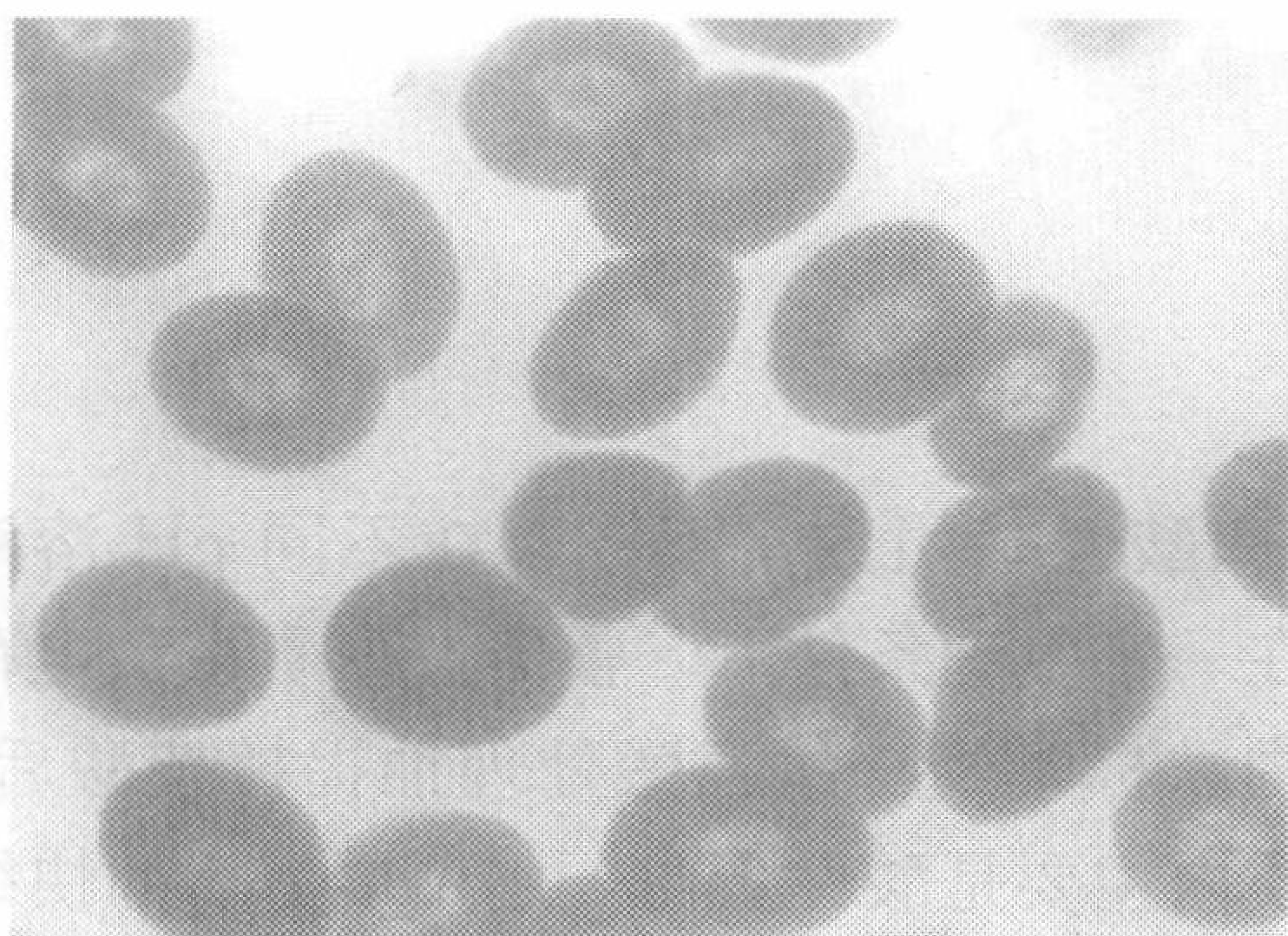


图 3-7　蟾蜍血涂片，显示细胞内酸性蛋白（酸性蛋白显示绿色，主要分布于细胞质内，少量分布于细胞核内，高倍镜）

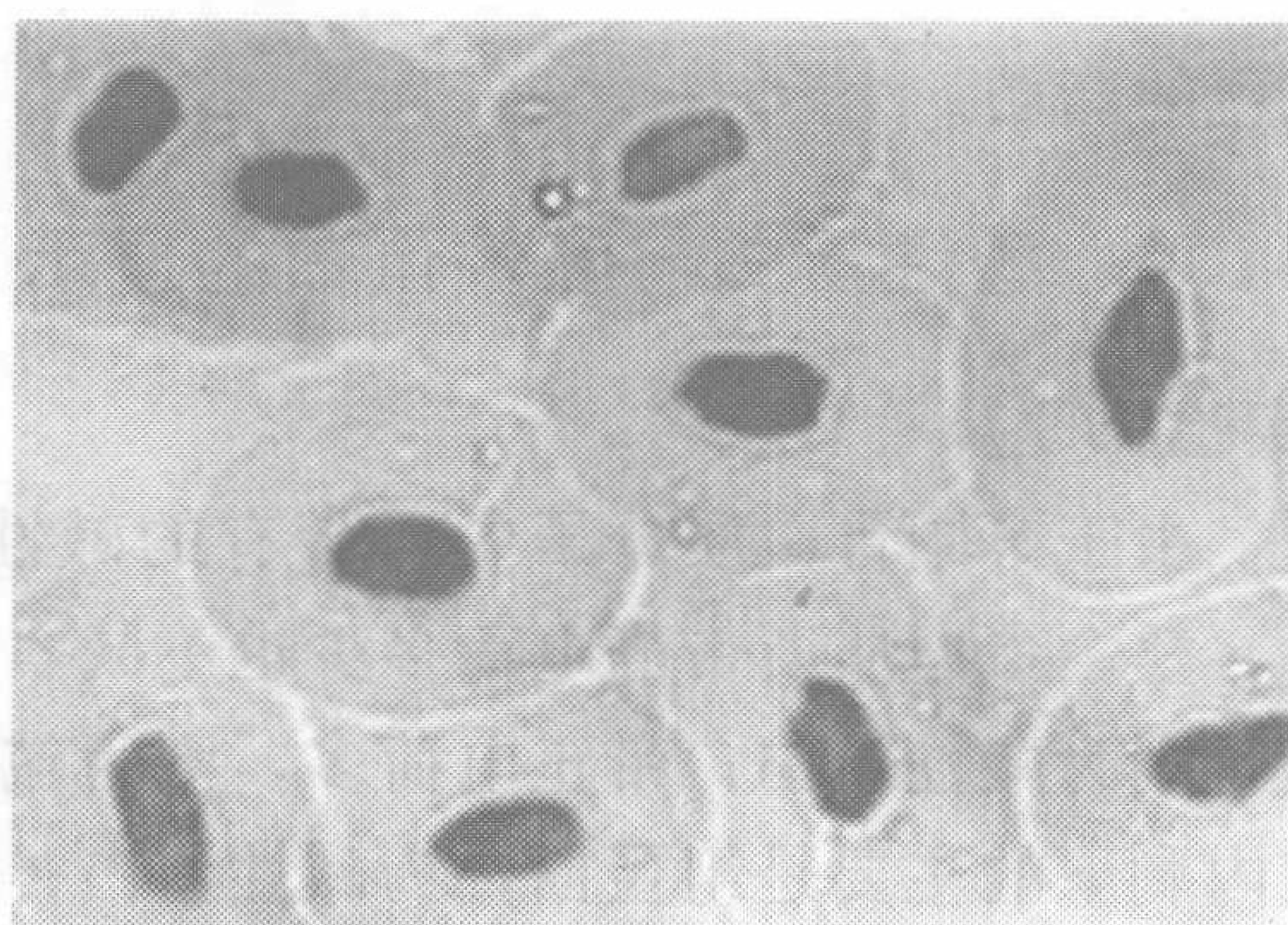


图 3-8　蟾蜍血涂片，显示细胞内碱性蛋白（碱性蛋白显示绿色，分布于细胞核内，油镜）

（邵红莲）

3.1.5　细胞骨架微丝蛋白的显示

【实验原理】

当成纤维细胞用适当浓度的 Triton X-100 处理时，可将质膜上和细胞内的蛋白质溶解，而骨架系统的蛋白质却不被破坏，经固定和考马斯亮蓝 R250 染色后，可使细胞骨架蛋白着色，而被显示。由于骨架系统中有些纤维（如微管）在该实验条件下不够稳定，而有些类型的纤维太细，在光学显微镜下无法分辨，因此显示看到的主要是微丝组成的微丝束。

【实验用品】

1. 器材

超净工作台、CO_2培养箱、倒置相差显微镜、解剖剪、眼科剪、眼科镊、吸管、移液管、培养皿、24 孔培养板、试管架。

2. 试剂

1）RPMI 1640 培养液、小牛血清

2）PBS（pH7.2）

氯化钠	8.0g
氯化钾	0.2g
磷酸氢二钠	1.15g
磷酸二氢钾	0.2g
蒸馏水	100ml

3）M-缓冲液（pH7.2）

咪唑（50mmol/L）	3.404g
氯化钾（50mmol/L）	3.7g
氯化镁（$MgCl_2 \cdot 6H_2O$）（0.5mol/L）	101.65mg
EGTA［乙二醇双（α-氨基乙基）醚四乙酸］（1mmol/L）	380.35mg
EDTA（乙二胺四乙酸）（0.1mmol/L）	29.224mg
巯基乙醇（1mmol/L）	0.07ml
甘油（4mol/L）	292ml
蒸馏水	至1000ml

用1mol/L HCl调至pH7.2，室温保存。

4）1%Triton X-100液

Triton X-100（聚乙二醇辛基苯基醚）	1ml
M-缓冲液	99ml

5）3%戊二醛液

戊二醛 25%	3ml
PBS液（pH7.2）	97ml

6）0.2%考马斯亮蓝 R250 染液

考马斯亮蓝 R250	0.2g
甲醇	46.5ml
冰醋酸	7ml
蒸馏水	46.5ml

3. 材料

体外培养的成纤维细胞爬片。

【方法与步骤】

(1) 取出载有单层培养细胞的盖玻片放在小培养皿中，用PBS洗涤3次，每次2min。

(2) 将盖片条浸在1%Triton X-100的小培养皿中室温下15～20min，以去除骨架以外的部分蛋白质。

(3) 立即用M-缓冲液轻轻洗涤3次，每次3min，使细胞骨架稳定。

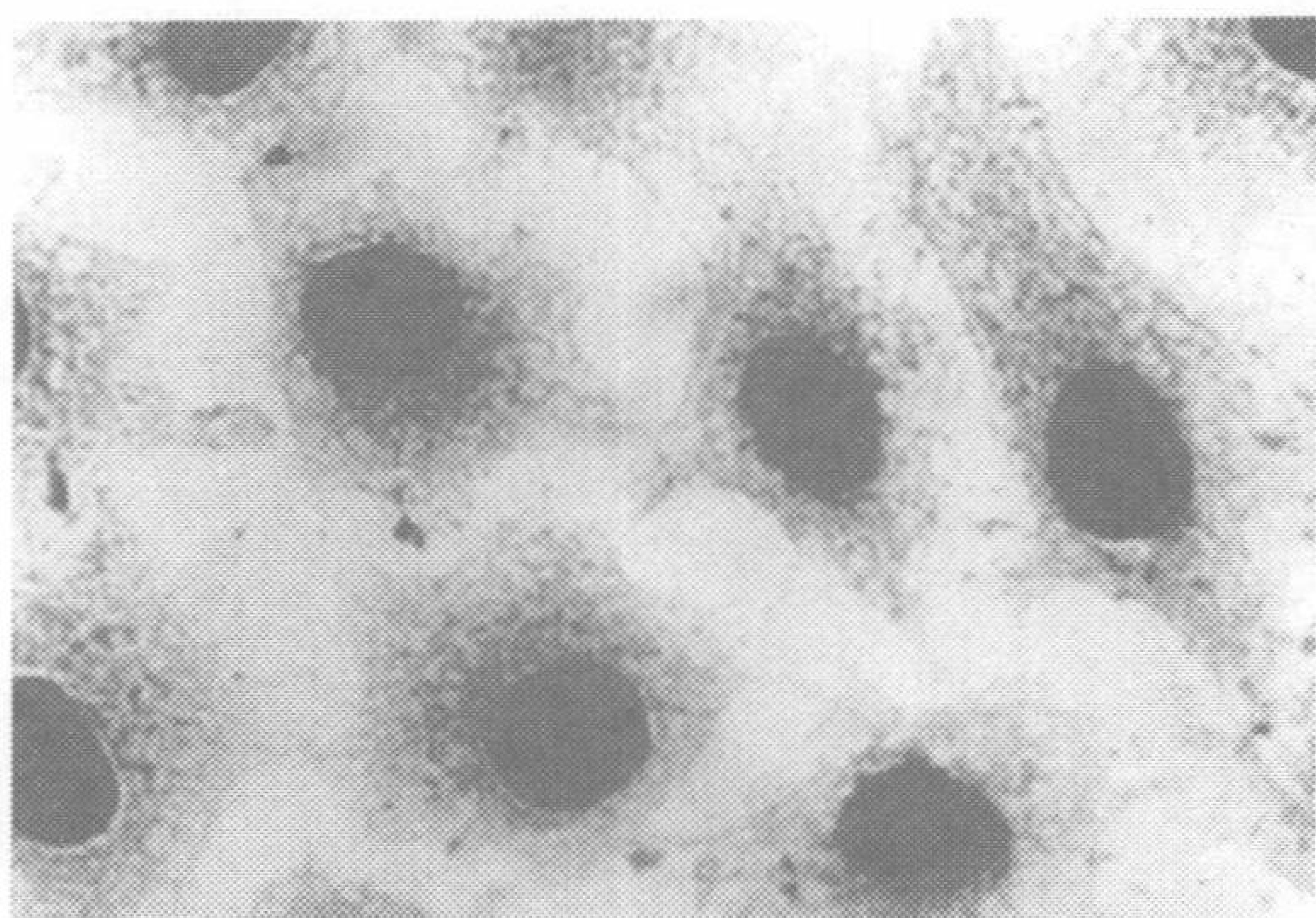


图 3-9 体外培养的肝癌细胞，显示细胞内微丝束分布（分布于细胞质内，被染成蓝色，油镜）

(4) 在3%戊二醛液中固定10min，再用PBS洗涤数次，每次2～3min，取出盖片条，吸去多余液体。

(5) 细胞面向上平放于载玻片上，滴加0.2%考马斯亮蓝 R250 染液染色 5～15min，自来水冲洗1～2次，干燥后二甲苯透明，封片。

【结果与观察】

在光镜下可见一些充分伸展的成纤维细胞中，分布着沿细胞长轴方向分布，被染成蓝色的纤维，这就是由许多微丝集聚而成的微丝束。在有些多角形细胞中，则可见纤维沿不同方向交叉分布，有的交织成网状结构（图 3-9）。

（邵红莲）

3.1.6 Feulgen 法显示核酸

【实验原理】

DNA 经弱酸（1mol/L HCl）水解后，DNA 分子中的嘌呤和脱氧核糖连接的糖苷键被打开，脱氧核糖的一端释放出醛基，醛基在原位与 Schiff 试剂结合形成紫红色产物。此法既可定位又可用显微分光光度计定量分析。

【实验用品】

1. 器材

水浴锅、载玻片、盖玻片、染色缸、显微镜。

2. 试剂

(1) 1mol/L HCl：浓盐酸 8.5ml，蒸馏水 91.5ml。

(2) 亚硫酸水、Schiff 试剂配方同 PAS 法。

3. 材料

鼠肝或睾丸石蜡切片。

【方法与步骤】

(1) 切片浸入二甲苯 5～10min 脱蜡，然后顺次浸入 100%、95%、90%、80%、70%、50%等梯度乙醇各 5min，再移入蒸馏水 3min。

(2) 移入冷 1mol/L HCl 3min。

(3) 移入 60℃1mol/L HCl 10min。

(4) 移入冷 1mol/L HCl 上浸洗。

(5) 移入蒸馏水稍漂洗。

(6) 移入 Schiff 试剂，30～60min。可随时检查显色程度。

(7) 移入亚硫酸水漂洗3次，每次2min，洗去假阳性颗粒。

(8) 自来水洗10～15min。

(9) 蒸馏水洗2min。

(10) 依次浸入70%、80%、90%、95%、100%乙醇各5min，进行脱水。

(11) 二甲苯透明5min，然后封片。

【结果与观察】

细胞核内DNA处显示紫红色，(图3-10)。

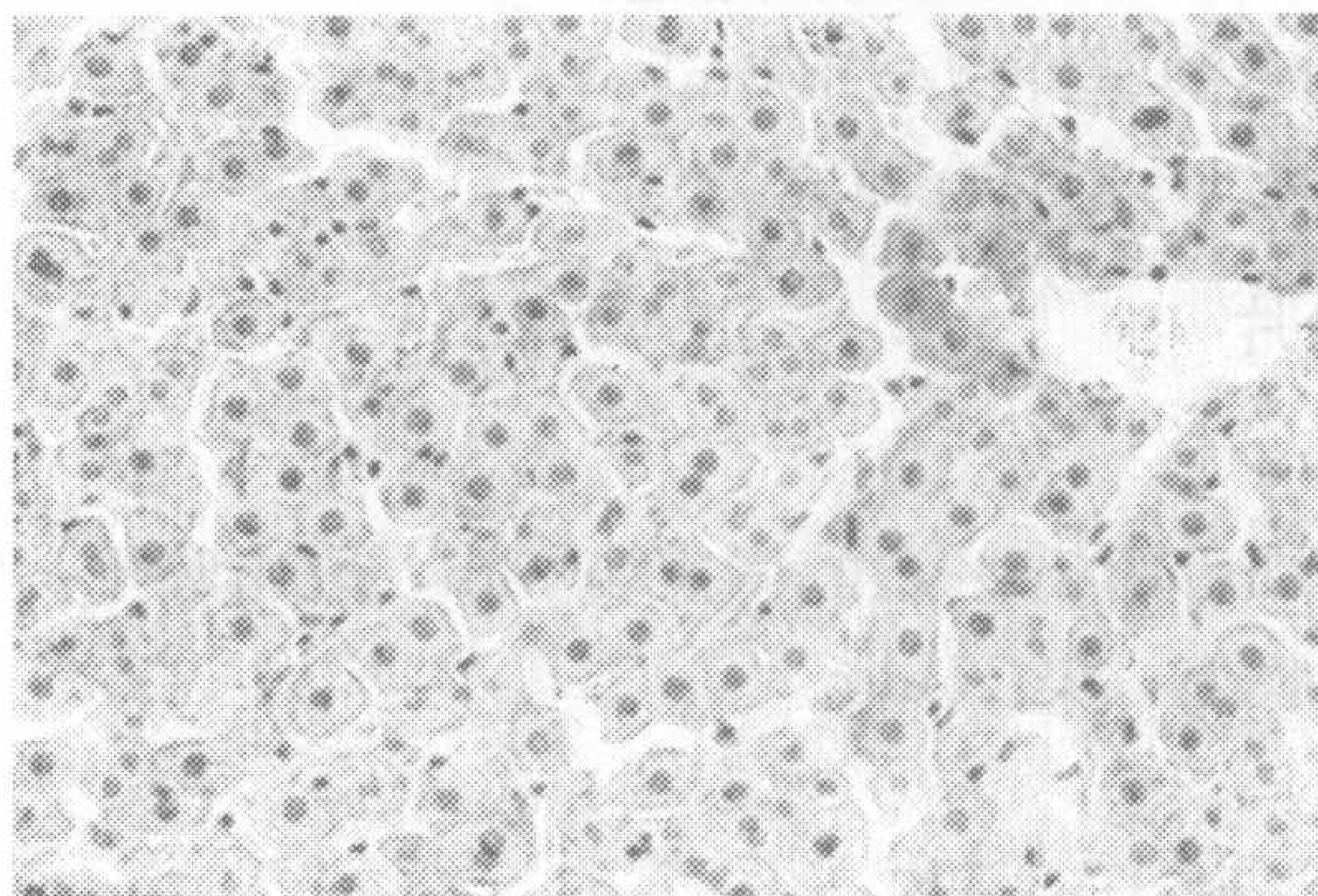


图3-10　小鼠肝切片，Feulgen反应显示细胞内DNA分布
(DNA显示紫红色，亮绿复染后细胞质呈绿色，高倍镜)

3.1.7　甲基绿-派洛吖法显示核酸

【实验原理】

DNA、RNA分子的磷酸根分别与甲基绿、派洛吖两种碱性染料形成盐键而被染色。DNA分子比RNA分子聚合程度高，甲基绿分子与DNA分子易结合，所以甲基绿显示DNA为绿色，而派咯吖染低聚分子RNA为红色。也有人认为染色原理与DNA分子的双螺旋空间构型有关（图3-11)。

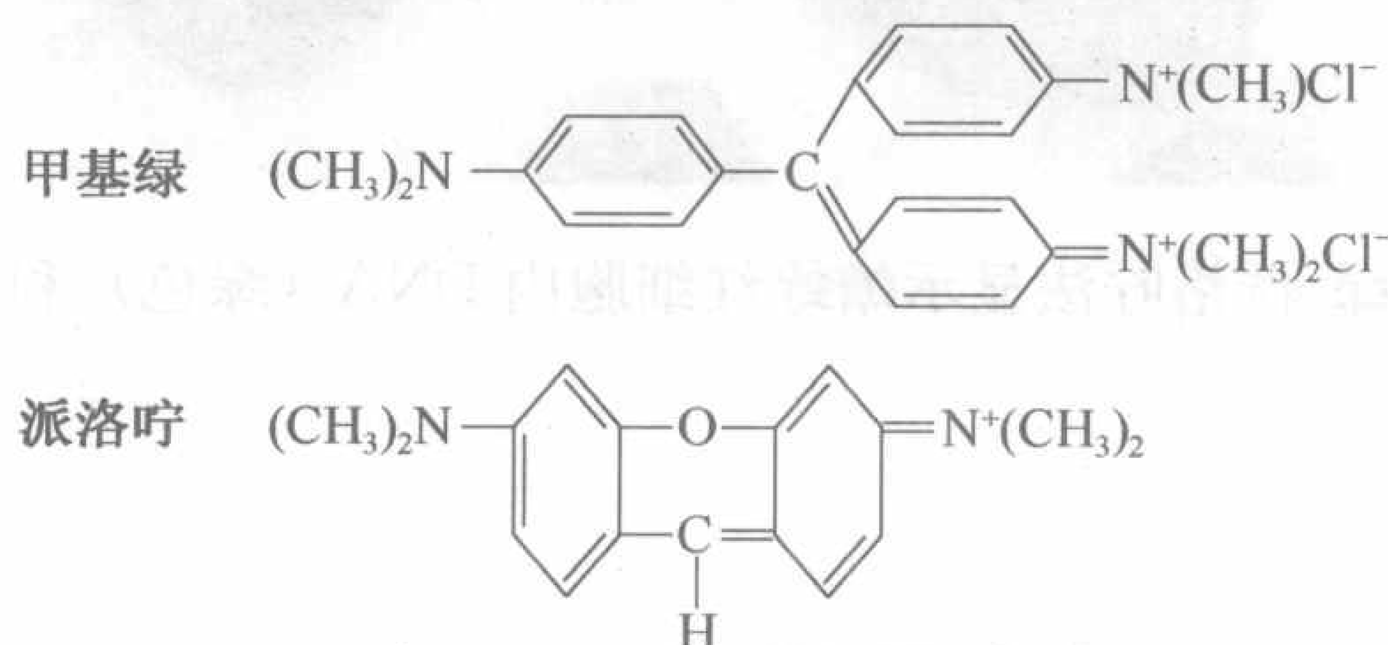


图3-11　甲基绿、派洛吖结构式

【实验用品】

1. 器材

注射器、载玻片、盖玻片、染色缸、显微镜。

2. 试剂

（1）0.2mol/L 乙酸缓冲液（pH4.8）：

A：冰乙酸 1.2ml 加蒸馏水至 100ml

B：2.72g 乙酸钠（$NaAC \cdot 3H_2O$）溶于 100ml 蒸馏水

使用时，A 液与 B 液按 2∶3 比例混合。

（2）甲基绿-派洛咛染色：

甲：2g 甲基绿加 0.2mol/L 乙酸缓冲液至 100ml

乙：1.0g 派洛咛加乙酸缓冲液至 100ml

使用时，甲液与乙液 5∶2 混合即成。

3. 材料：蟾蜍血涂片

【方法与步骤】

（1）蜍血涂片，干燥后用 70%乙醇固定 10min，取出晾干。

（2）滴染色液于血膜上，染 15min。

（3）蒸馏水冲洗。

（4）95%乙醇分色，晾干，封片。

【结果与观察】

蟾蜍红细胞的核因含 DNA 显绿色，细胞质及核仁因含 RNA 显示红色（图 3-12）。

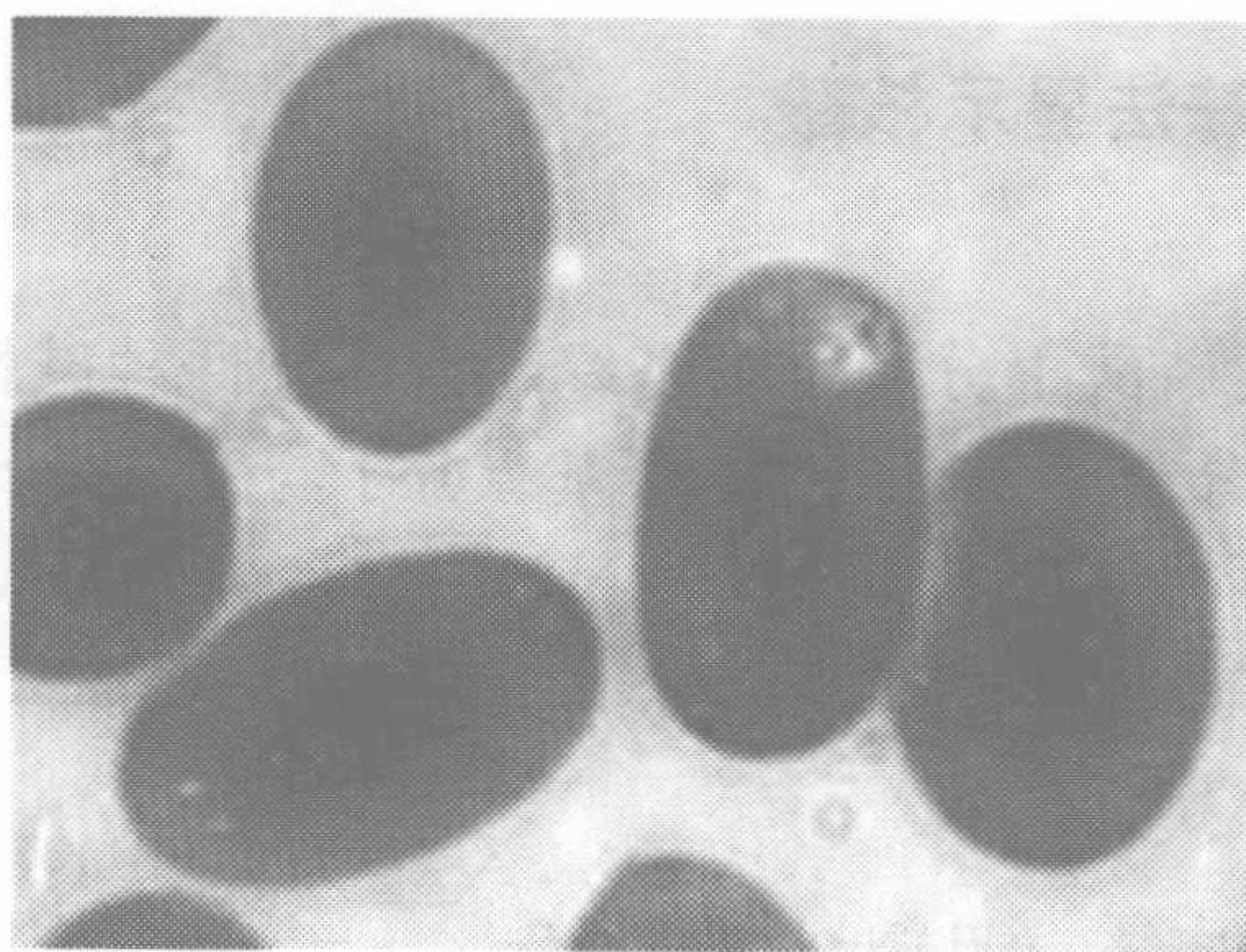


图 3-12　甲基绿-派洛咛法显示蟾蜍红细胞内 DNA（绿色）和 RNA（红色）

（邵红莲）

3.1.8　Giemsa 染色法显示染色质/体

【实验原理】

Giemsa 是一种复合染料，含有天青、伊红等，用于多种细胞的染色质和染色体染色。

【实验用品】

1. 器材

解剖剪、眼科剪、眼科镊、显微镜、载玻片、盖玻片。

2. 试剂

（1）Giemsa 原液。

Giemsa 粉	0.8g
甘油	50ml
甲醇	50ml

将 Giemsa 粉剂溶于甲醇中在研钵中充分研磨，溶解后再加甘油，混合摇匀，置于37℃中 8～12h，用有色玻璃瓶储存。

（2）PBS：先配成 1/15mol/L 的 A 液和 B 液。

A 液：11.876g Na_2HPO_4溶于 1000ml

B 液：9.078g KH_2PO_4溶于 1000ml

用时取 A 液 62ml 加 B 液 38ml 混合即成为 pH7.0 的 PBS

（3）甲醇。

（4）Giemsa 染液：2ml Giemsa 原液加 PBS 至 10ml。

3. 材料

体外培养的人肝癌 HepG2 细胞。

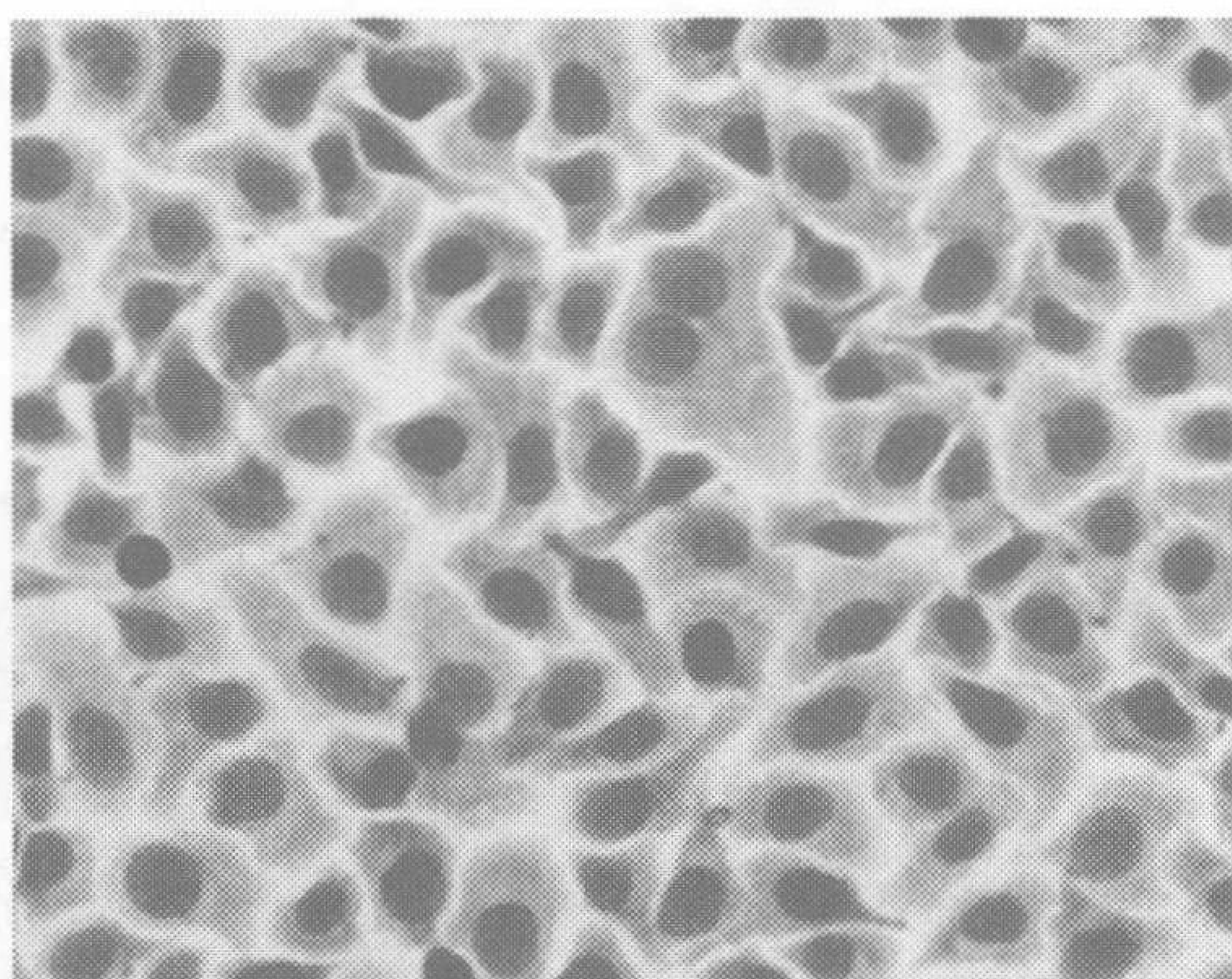


图 3-13　人肝癌 HepG2 细胞 Giemsa 染色（×200）

【方法与步骤】

（1）取出盖玻片，PBS 轻轻漂洗 2 次。

（2）充分干燥。

（3）甲醇固定 5～10min。

（4）空气干燥。

（5）Geimsa 工作液染色 10～20min。

（6）流水冲洗。

（7）充分干燥。

（8）二甲苯透明 2min，中性树胶封片。

【结果与观察】

人肝癌 HepG2 细胞核内染色体被染成蓝紫色，呈圆形，较大，细胞质染成浅蓝色（图 3-13）。

（邵红莲）

3.1.9　苏木精-伊红染色显示细胞核和细胞质

【实验原理】

苏木精是染细胞的优秀染料。它对组织亲和力很小，不能单独使用，需配以氧化剂，如碘酸钠、高锰酸钾等使其脱氢成为苏木红，或令其在空气中自然氧化，并加入带强正电荷的复盐，如铁明矾、铬矾、钾矾等，配成混合液使用。

伊红是细胞质染料，一般配成 0.5%～1%水溶液或乙醇溶液使用。伊红主要用来复染细胞质。

【实验用品】

1. 器材

恒温蜡箱、石蜡切片机、载玻片、盖玻片、染色缸、显微镜。

2. 试剂

(1) Ehrlich 苏木精染液：

苏木精	2g
95%乙醇	100ml
溶解后加入：	
钾矾	3g
纯甘油	100ml
冰乙酸	10ml
蒸馏水	200ml

(2) 伊红染液：

伊红 1g 溶于 100ml 90%乙醇

3. 材料

蝾螈小肠石蜡切片。



图 3-14　蝾螈小肠绒毛上皮细胞（HE 染色，高倍镜）

【方法与步骤】

(1) 石蜡切片经二甲苯脱蜡 5～10min，然后依次浸入 100%、95%、90%、80%、70%、50%等各级乙醇各 3～5min，再浸入蒸馏水 3min。

(2) 浸入苏木精染液 15～30min。

(3) 自来水或淡氨水变蓝。

(4) 70%乙醇分色至粉红色。

(5) 自来水变蓝。

(6) 依次浸入蒸馏水，50%、70%、80%、90%乙醇各 3min。

(7) 浸入伊红染液 1min。

(8) 浸入 100%酒精 1min。

(9) 二甲苯透明，封片。

【结果与观察】

低倍镜下观察可见蝾螈小肠内层是由排列整齐的柱状细胞组成。在高倍镜下可见柱状细胞间有清晰的界限，细胞顶端游离面染色较深，是由微绒毛组成的刷状缘。细胞核为椭圆形，位于细胞中央稍靠基底面，紫蓝色，胞质为粉红色（图 3-14）。

（邵红莲）

3.2　酶细胞化学

酶是一类催化生物化学反应、对底物具有高度特异性的特殊蛋白质。生物体内酶的种类很多，由于结构不同，因而功能各异，可分为氧化还原酶类、转移酶类、水解酶类、裂解酶类、异构酶类、连接酶或合成酶类等。各类酶又包含许多种，如氧化还原酶（包括脱氢酶、氧化酶、过氧化物酶和加单氧酶等）、水解酶类（包括酯酶、糖苷酶和肽酶等）。细胞内的代谢过程就是在酶的参与下进行的，酶的正常与否反映了机体的功能。

显示组织细胞内特定的酶有两类方法：一是利用酶的活性反应的方法，二是利用抗原抗体反应的方法。酶组织化学是指前者，后者归属于免疫细胞化学。利用细胞内酶催化分解其相应的底物，形成产物，再通过其他各种方法把形成的产物显示出来，并借助光学显微镜或电子显微镜观察研究酶在组织细胞内的定位及其活性变化规律的科学就是酶细胞化学。

3.2.1　酶细胞化学的基本理论

【技术要求】

制备高质量的酶组织化学标本片过程应遵循以下原则：①制片过程一定要保持酶的活性及分布；②所选择的酶的底物和辅助物必须能迅速和同步地渗透到组织细胞中去；③所选择的底物应只被所检测的酶催化分解；④为防止酶催化分解的初反应产物溶解扩散，必须使初反应产物能迅速与辅助物反应生成终产物，且终反应产物是水不溶性的有色而稳定的物质，沉积在酶所在的部位。

酶的保存最关键且困难较多，在保持酶活性的同时还要防止其扩散以便准确定位。既要保持细胞的完整结构又要保持酶的活性是矛盾的，温度对酶活力有很大的影响，高于37℃时酶往往失去活性，通常操作过程的合适温度是4～30℃，因此石蜡包埋法（熔化石蜡的温度52～55℃）不适用于酶的组织化学，而常采用新鲜组织直接冷冻切片的办法，但由于酶是水溶性的，直接冰冻切片易发生酶扩散；解决这个问题的办法是采用固定液固定，酶的固定剂的选择很重要，常选择对酶活力影响小的固定剂，如：显示酸性磷酸酶或碱性磷酸酶可用甲醛类试剂于4℃固定，既能保存细胞的形态结构又很好地保持了酶的活性。也有某些酶在固定时酶活性就部分或全部消失。所以应根据所要显示的酶的情况将新鲜组织进行固定或不固定后进行冰冻切片。冰冻切片比起石蜡切片来既方便又快速，缺点是冰冻切片不如石蜡切片薄，厚度一般为10～20μm，显微镜下的组织结构不如石蜡切片清晰。

【标本片的制备】

酶组织化学常用冰冻切片，目前常用的冷冻切片仪器主要有两种。

1. 半导体制冷切片机

主要由整流电源、冷刀和冷台及滑动切片机构成，整流电源控制冷刀和冷台的温度，用时要先接通散热器的环流水，再接通电源，等冷刀和冷台冷却恒温至最低温度约－30℃时，将新鲜组织或固定后组织置于滴有透明胶水的冷台上迅速冷冻，调整好滑动

切片机上冷刀的位置后，进行切片，一般切为 10μm，每切一片，将干净的载玻片轻轻靠近切下的冰冻组织片，组织片会迅速贴在玻璃片上，然后继续进行酶化学反应。

2. 恒冷箱切片机

主要原理是在一个横冷的低温箱内使切片刀和样品保持恒定低温，一般样品温度达－10℃～－20℃左右，样品温度过高，切片湿润黏附在刀上，样品温度过低，切片易碎，冷刀的温度略低一般－25℃～－15℃左右，温度过高，切片变软不能切成薄片，恒冷切片机可切下厚度达 5～10μm 的薄片。

冰冻切片的贴片较简单。一般新鲜组织的切片直接用干净的载玻片黏附就比较牢固，贴片后可进行酶化学孵育反应，并进行后固定和封片；固定后组织的冰冻切片直接黏附于干净载玻片上不牢固，应预先涂抹粘贴剂在载玻片上，然后贴片，并在 37℃温箱内烘制 1～15h，再进行显色反应和封片。

除了冰冻切片外还可以用冷冻的载玻片制备成滴片、细胞涂片等，培养细胞的爬片也可用于酶细胞化学显示。

【酶的显示方法】

酶的化学显示法就是在一定条件下，使组织细胞内的酶作用于底物，形成初级反应产物，初级反应产物在作用部位被其他试剂捕捉，生成有色的沉淀物即为最终反应产物，最终反应产物间接显示了酶的存在。酶组织化学反应主要有金属沉淀法、偶氮偶联法、色素形成法、电子传递法等类型。

1. 金属沉淀法

利用酶反应的分解产物与金属化合物反应生成有色沉淀，借以显示所检测的酶的活性。

2. 偶氮偶联法

用人工合成的酶底物（多为萘酚族化合物）在酶的作用下产生分解产物，后者与重氮盐结合形成不溶性的偶氮色素。

3. 联苯胺色素法

过氧化酶分解 H_2O_2 产生新生氧，后者再将无色联苯胺氧化成联苯胺蓝，进而形成联苯胺黑化合物。

4. 四唑盐法显示脱氢酶

脱氢酶催化底物脱下来的氢与无色的四唑盐类物质结合将其还原成红色或蓝色甲臜或二甲臜而显示酶的存在。

5. 吲哚酚法

以酯型吲哚酚化合物为酶的底物，酶作用于底物后分解出作用吲哚酚，在氧的存在下形成蓝色靛蓝从而显示酶的存在。

酶反映所需的 pH 大部分为 pH7.0，但碱性磷酸酶在 pH9.2，酸性磷酸酶在 pH5.0 时活力最大。某些抑制剂（如四异丙基焦磷酰胺对胆碱酯酶）有抑制作用，而某些金属离子（如 Mg^{2+}）能促进酶活性。

【标本片的封固】

酶细胞化学标本片也应封固后观察及保存，常用的封固剂是甘油缓冲液封固剂（甘油与 0.01mol/L 的 pH7.2 的 PBS 以 9∶1 混合），也可用甘油明胶封固剂（将白明胶与蒸馏水热水浴或 37℃过夜使其完全溶解后加入 80ml 甘油，水浴中加热 5min 并混匀，加几粒麝香草酚防腐剂即成）。

【对照方法】

对照方法在酶细胞化学中非常重要，许多酶在保存时被破坏而得出假阴性或因其他酶的作用或操作问题得出假阳性。做酶组织化学实验时，应同时设有阴性和阳性实验对照，以证实孵育底物的真实的阳性反应及底物的特异性。阳性对照片使用存在该酶的已知组织，这样可证明试剂已起作用，阴性对照片通常的方法是：用沸水或一种化学药品破坏标本片上的酶，或将阴性对照片放入去除底物的孵育液，或在孵育液中加入酶的特异性抑制剂。

（邵红莲）

3.2.2　碱性磷酸酶显示

3.2.2.1　偶氮偶联法显示碱性磷酸酶

【实验原理】

细胞中碱性磷酸酶在碱性条件下（pH9.0～9.4）使孵育液中的底物 α-萘酚磷酸钠水解产生 α-萘酚，后者再与偶氮盐偶联生成不溶性的耐晒染料，其最终颜色由所用的偶氮盐种类不同而异（图 3-15）。

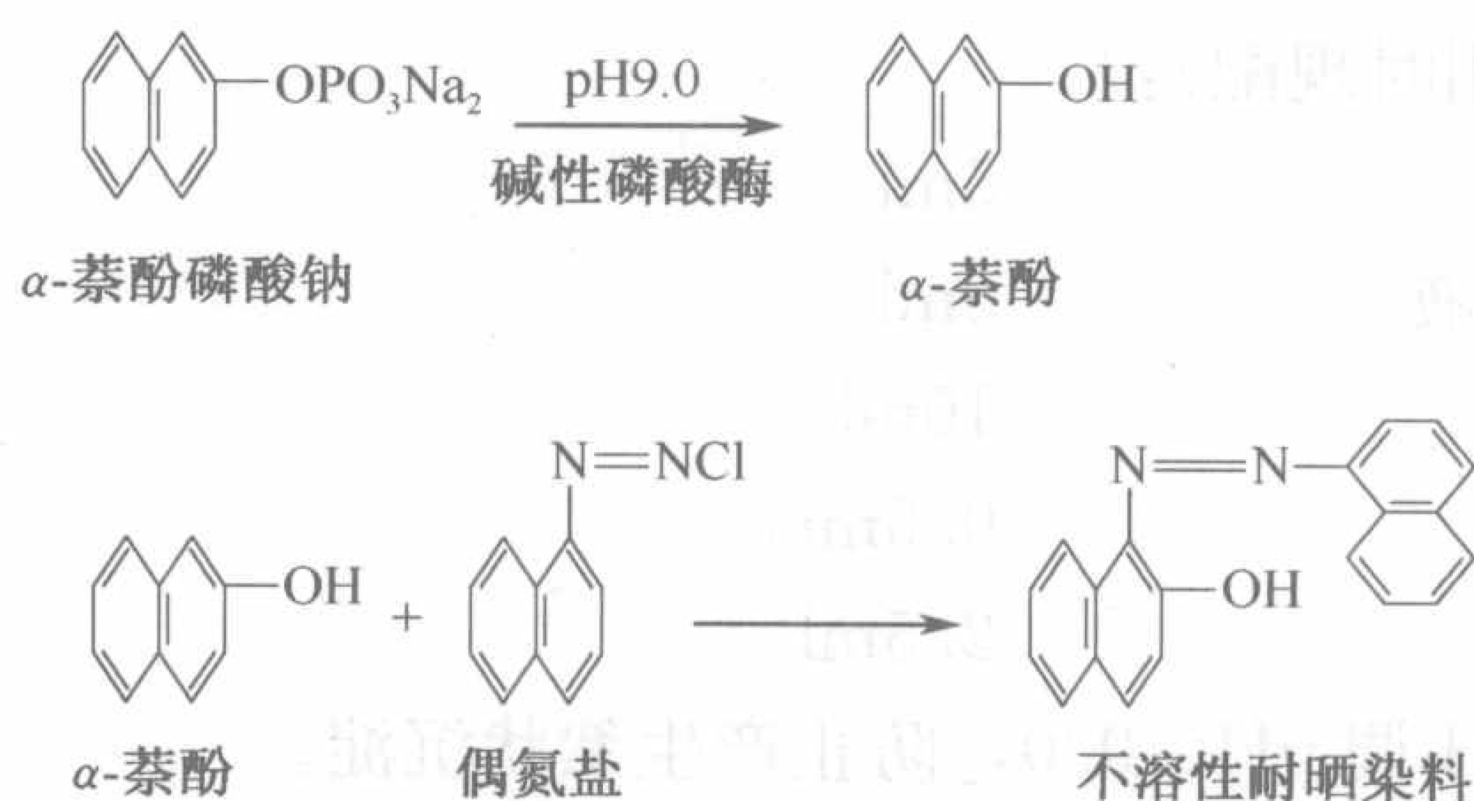


图 3-15　碱性磷酸酶反应原理

【实验用品】

（1）器材：眼科镊、载玻片、盖玻片、染色缸、显微镜、冰冻切片机。

（2）试剂：孵育液：α-萘酚磷酸钠 10mg，0.2mol/L pH10 Tris-HCl 10ml，坚牢蓝 B 10mg，配好后立即过滤使用。2%甲基绿水溶液。甘油明胶。

（3）材料：小鼠肾冰冻切片。

【方法与步骤】

（1）新鲜取材的小鼠肾组织直接冰冻切片。

（2）室温下浸入孵育液 20min 左右。

（3）蒸馏水洗数次。

（4）甲基绿复染细胞核 10min。

（5）水洗，甘油明胶封片。

【结果与观察】

细胞质紫黑色物质即为碱性磷酸酶所在的部位，细胞核为绿色。

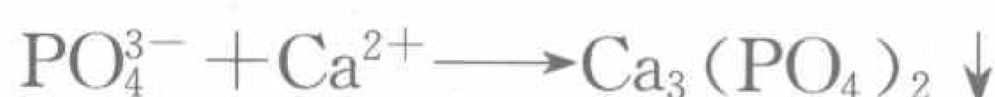
3.2.2.2 金属沉淀法显示碱性磷酸酶

【实验原理】

细胞中碱性磷酸酶在碱性条件下（pH9.0～9.4）使孵育液中的底物β-甘油磷酸钠水解产生磷酸根，后者与钙离子生成不溶性的磷酸钙白色沉淀，磷酸钙与硝酸钴生成不溶性的磷酸钴，进而最终与硫化氨反应形成硫化钴黑色沉淀。



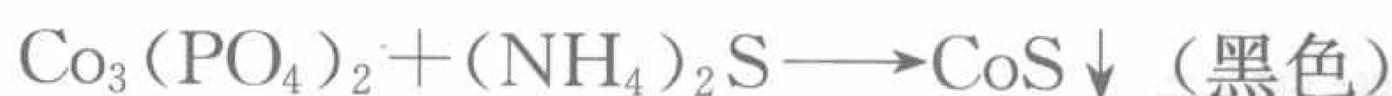
β-甘油磷酸钠⟶甘油 + PO_4^{3-}



$PO_4^{3-} + Ca^{2+} \longrightarrow Ca_3(PO_4)_2\downarrow$



$Co^{2+} + Ca_3(PO_4)_2 \longrightarrow Co_3(PO_4)_2\downarrow$



$Co_3(PO_4)_2 + (NH_4)_2S \longrightarrow CoS\downarrow$（黑色）

【实验用品】

1. 器材

注射器、解剖剪、眼科剪、眼科镊、恒温水浴锅、载玻片、盖玻片、染色缸、显微镜。

2. 试剂与配方

（1）作用液（临用时现配）：

试剂	用量
2%巴比妥钠	5ml
3%β-甘油磷酸钠液	5ml
2%$CaCl_2$	10ml
2%$MgSO_4$	0.5ml
蒸馏水	2.5ml

轻轻混匀，NaOH 调 pH=9.0，防止产生絮状沉淀。

（2）2%Co（NO_3）$_2$。

（3）2%硫化铵液（临用时现配）：硫化铵 2ml+蒸馏水 98ml。

（4）甘油明胶封片剂：将 15g 明胶与 100ml 蒸馏水热水浴或 37℃过夜使其完全溶解后加入 80ml 甘油，水浴中加热 5min 并混匀，加几粒麝香草酚防腐剂即成。

3. 材料

小鼠肾冰冻切片。

【方法与步骤】

(1) 制备小鼠肾冰冻切片。

(2) 放入37℃作用液中10min；阴性对照切片浸入缺少底物β-甘油磷酸钠液的溶液中作用10min。

(3) 流水冲洗5min。

(4) 浸入2% $Co(NO_3)_2$中5min。

(5) 蒸馏水漂洗。

(6) 2% $(NH_4)_2S$中2min。

(7) 蒸馏水洗，封片，观察。

【结果与观察】

小鼠肾组织冰冻切片上显黑色的部位即为碱性磷酸酶所在，主要分布在肾小管上皮细胞的游离面刷状缘处(图3-16)。

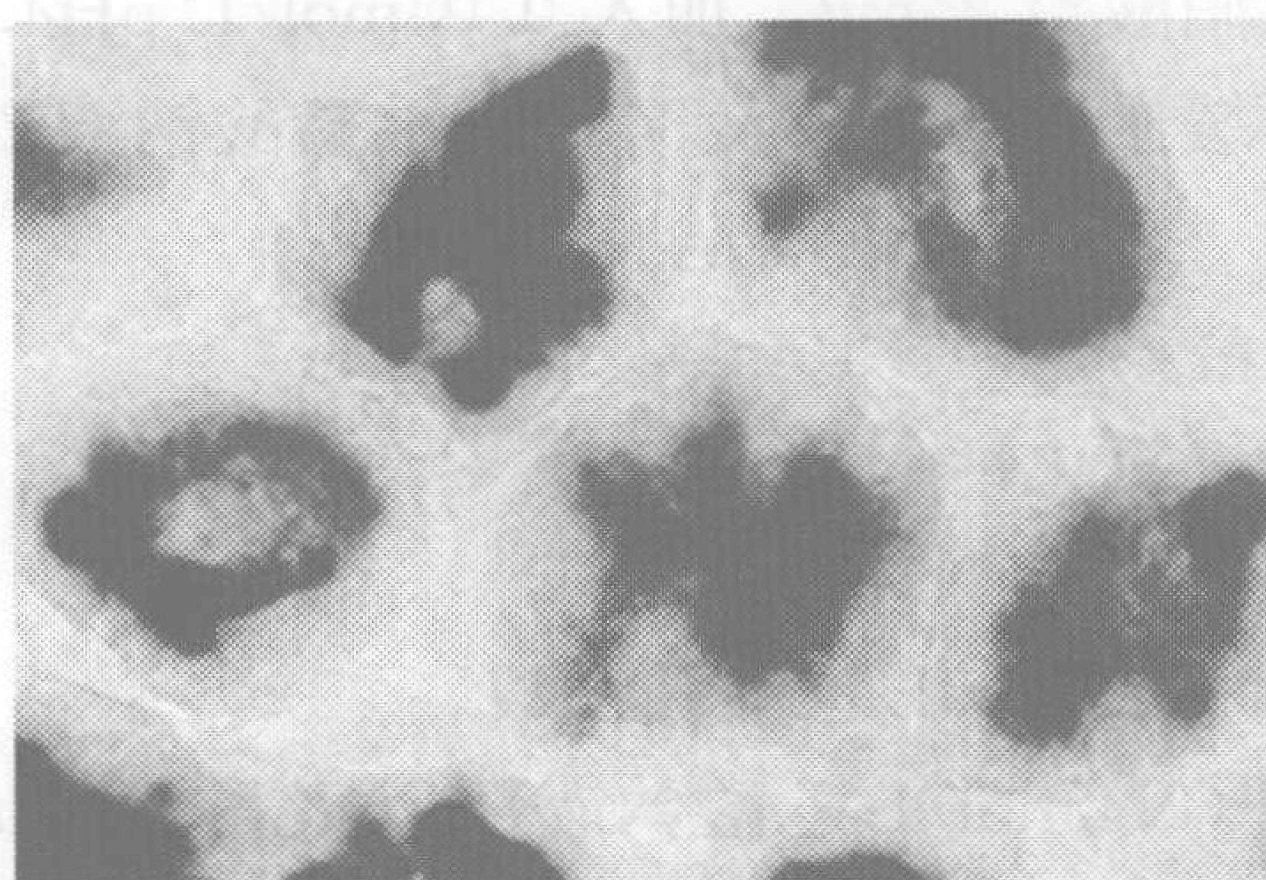


图3-16 小鼠肾组织冰冻切片显示碱性磷酸酶(黑色)

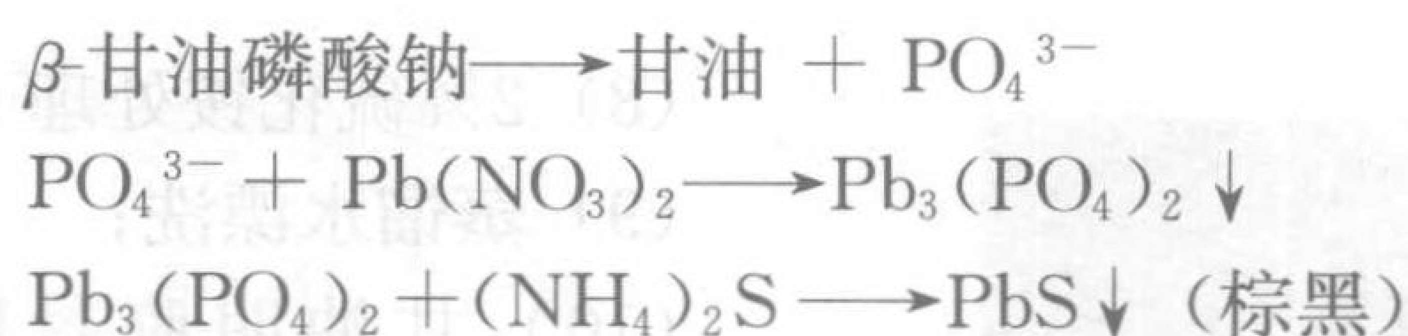
(邵红莲)

3.2.3 金属沉淀法显示酸性磷酸酶

【实验原理】

酸性磷酸酶(acid phosphase，ACP)广泛存在于动物组织。在前列腺、脾及肝中最丰富。ACP在组织细胞蜕变过程中活性增强。在大部分组织中，它主要定位于溶酶体内。在溶酶体膜稳定完整时，底物不易渗入，ACP活力微弱或无活性。经固定后，在合适pH条件下，膜本身变为不稳定，逐渐改变其渗透性，底物可以渗入，酶活力被显示。

此酶在pH5.0左右发生作用，能分解磷酸酯而释放出磷酸基，PO_4^{3-}可与铅盐结合形成磷酸铅沉淀，因其是无色的，须再与黄色的硫化铵作用，生成棕黑色PbS沉淀而被显示出来。



β-甘油磷酸钠⟶甘油 + PO_4^{3-}

$PO_4^{3-} + Pb(NO_3)_2 \longrightarrow Pb_3(PO_4)_2\downarrow$

$Pb_3(PO_4)_2 + (NH_4)_2S \longrightarrow PbS\downarrow$ (棕黑)

【实验用品】

1. 器材

注射器、解剖剪、眼科剪、眼科镊、恒温水浴锅、载玻片、盖玻片、染色缸、显微镜。

2. 试剂

1) 6%淀粉肉汤

牛肉膏　　0.3g

蛋白胨　　1.0g

氯化钠　　　　　0.5g
可溶性淀粉　　　6.0g
蒸馏水 100ml 煮沸灭菌，4℃保存，使用时温热水融化。

2）酸性磷酸酶作用液（临用时现配）

取硝酸铅 25mg，加入 0.05mol/L pH4.8 乙酸缓冲液 22.5ml，搅动使之全部溶解后，再缓慢地逐滴加入 3%β-甘油磷酸钠液 2.5ml，边加边搅动，防止产生絮状沉淀。

3）福尔马林钙固定液

甲醛　　　　10ml
10%氯化钙　10ml
蒸馏水　　　80ml

4）0.05ml/L 乙酸缓冲液

A（0.2mol/L 乙酸钠液）：冰乙酸 1.2ml＋蒸馏水至 100ml
B（0.2mol/L 乙酸钠液）：乙酸钠（NaAc·3H_2O）2.72g 加蒸馏水 100ml
A 液 30ml＋B 液 70ml＋蒸馏水 300ml，即成 0.05mol/L 乙酸缓冲液，4℃保存。

5）2%硫化铵液（临用时现配）

硫化铵 2ml＋蒸馏水 98ml

3. 材料

小鼠腹腔液涂片

【方法与步骤】

（1）鼠每日腹腔注射 6%淀粉肉汤 1ml，连续注射 3 天；
（2）第三天注射 3～4h 后，颈椎脱臼处死小鼠；
（3）剖开腹腔，吸取腹腔液用冷冻的干净载玻片制备细胞涂片；
（4）浸入 37℃作用液 30min；
（5）蒸馏水漂洗；
（6）10%福尔马林钙后固定 5min；
（7）蒸馏水洗；
（8）2%硫化铵处理 3～5min；
（9）蒸馏水漂洗；
（10）甘油明胶封固或脱水、透明、树胶封固。

对照实验：浸入作用液前先用高温（50℃）处理 30min，使酶失去活性，做好标记，然后同时进行上述过程。

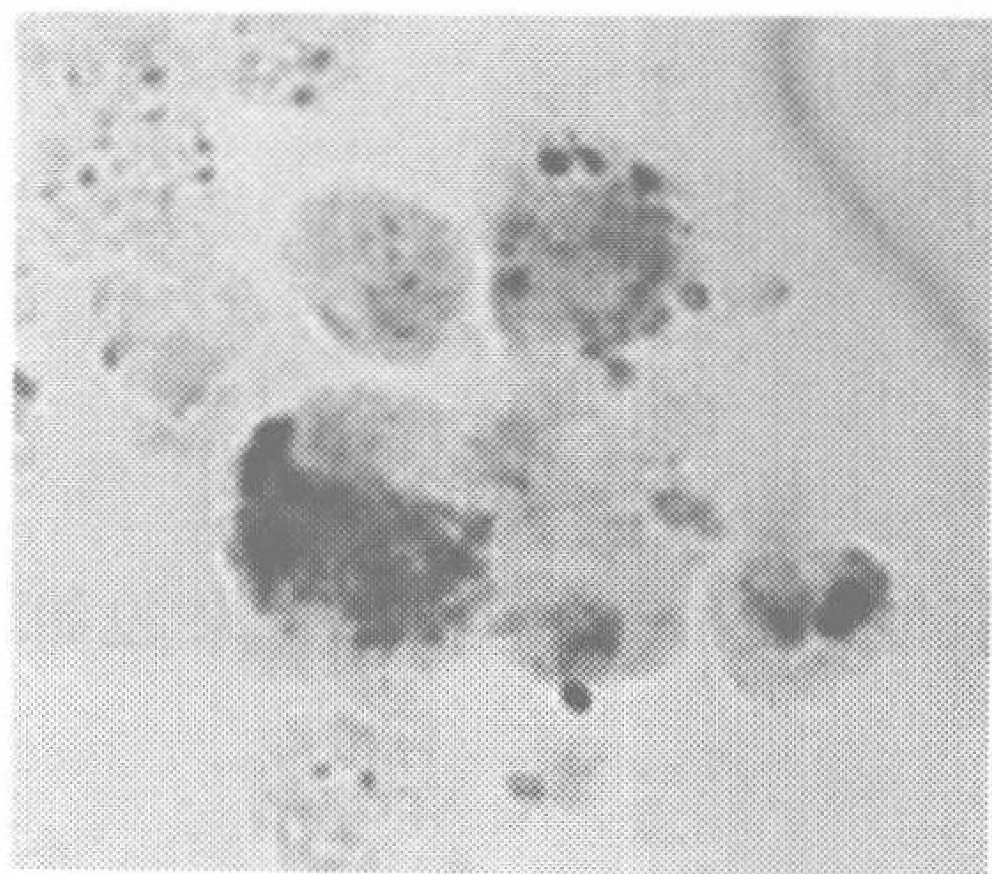


图 3-17　小鼠腹腔巨噬细胞涂片显示细胞内酸性磷酸酶（油镜）

【结果与观察】

小鼠腹腔巨噬细胞为不规则形状，阳性细胞内分布有棕褐色颗粒即为酸性磷酸酶所在位置（图 3-17）。

（邵红莲）

3.2.4 联苯胺法显示过氧化物酶

【实验原理】

过氧化物酶（peroxidase）能把许多胺类氧化为有色化合物，联用苯胺混合液处理标本，细胞内的过氧化物酶把联苯胺氧化为蓝色联苯胺蓝，后者不稳定，自然转变为棕色联苯胺腙。

【实验用品】

（1）器材：解剖剪、眼科剪、眼科镊、载玻片、盖玻片、染色缸、显微镜。

（2）试剂：

联苯胺混合液：

联苯胺	0.2g
蒸馏水	100ml
3% H_2O_2	2 滴

（3）材料：小鼠骨髓涂片。

【方法与步骤】

（1）脱臼法处死小鼠，取股骨，将一端剪断，再用牙签挑起骨髓作涂片；

（2）晾干后入 0.5% $CuSO_4$ 中固定 30s；

（3）浸入联苯胺作用液 3min；

（4）蒸馏水洗后，晾干封片。

【结果与观察】

骨髓细胞中有一些被染成棕色颗粒，即为过氧化物酶存在的部位（图 3-18）。

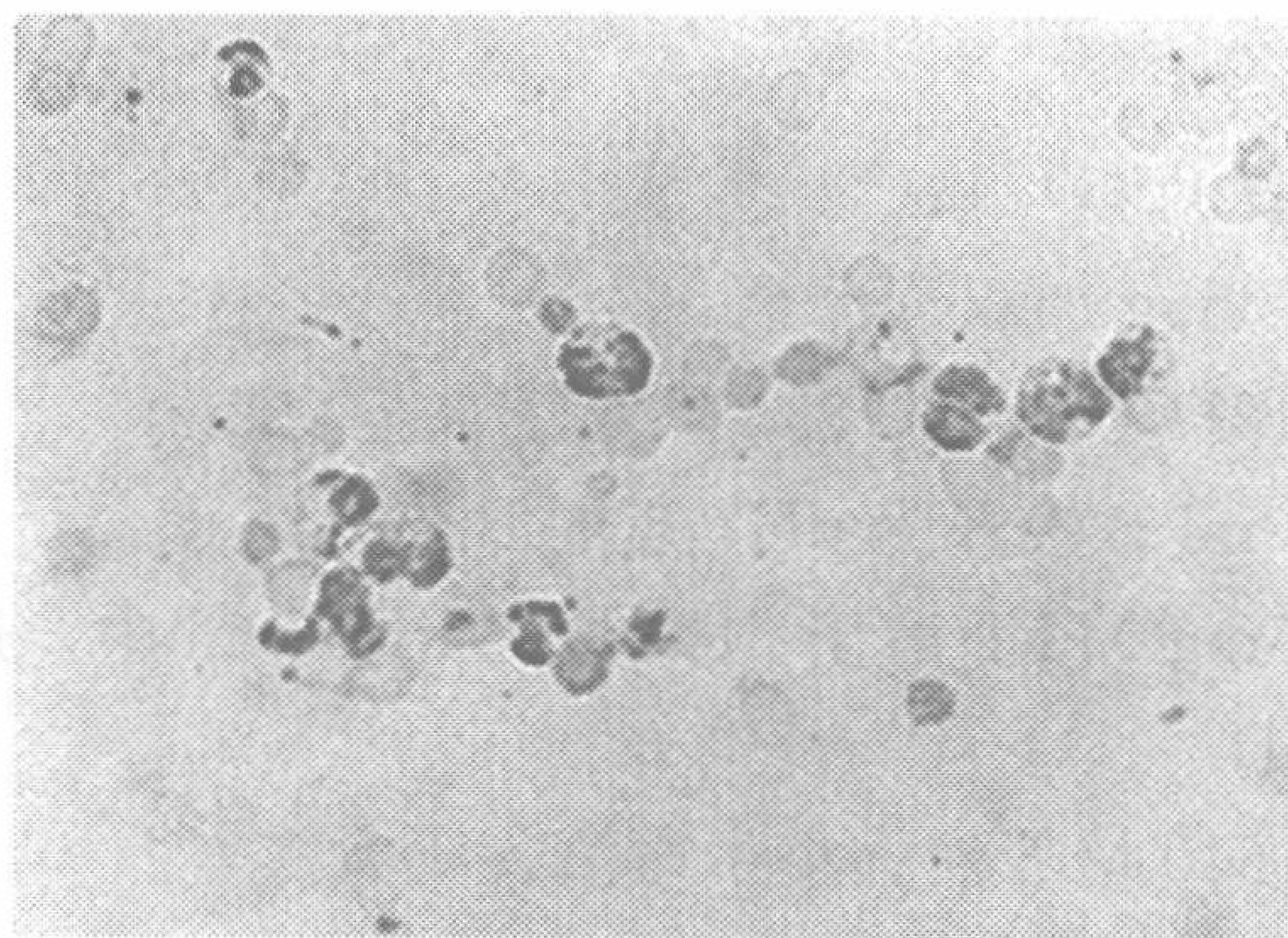


图 3-18 小鼠骨髓涂片显示细胞内过氧化物酶（棕黄色，高倍镜）

（邵红莲）

3.2.5 通过琥珀酸脱氢酶活性进行 MTT 法检测细胞相对存活率

【实验原理】

活细胞进行生命活动需要能量，而线粒体是能量转换生成 ATP 的重要场所，线粒体内膜呼吸链上的重要的酶——琥珀酸脱氢酶（succinate dehydrogenase，SDH）可被视为线粒体的标志，因此细胞内琥珀酸脱氢酶的活力间接显示了该细胞的活力。

琥珀酸脱氢酶可使其底物脱氢，脱下的氢能将四甲基偶氮唑盐（MTT）还原成蓝紫色的甲臜（formazan）颗粒。甲臜颗粒被有机溶剂如二甲基亚砜溶解后呈现的颜色深浅可通过酶联仪测出光密度值，通过光密度（OD）值可比较不同实验组内细胞的相对存活比率（图 3-19）。该法常用在体外培养细胞对抗癌药物敏感性的测试上，具有快速、简便、灵敏等优点，是常用而必备的细胞生物学检测方法。

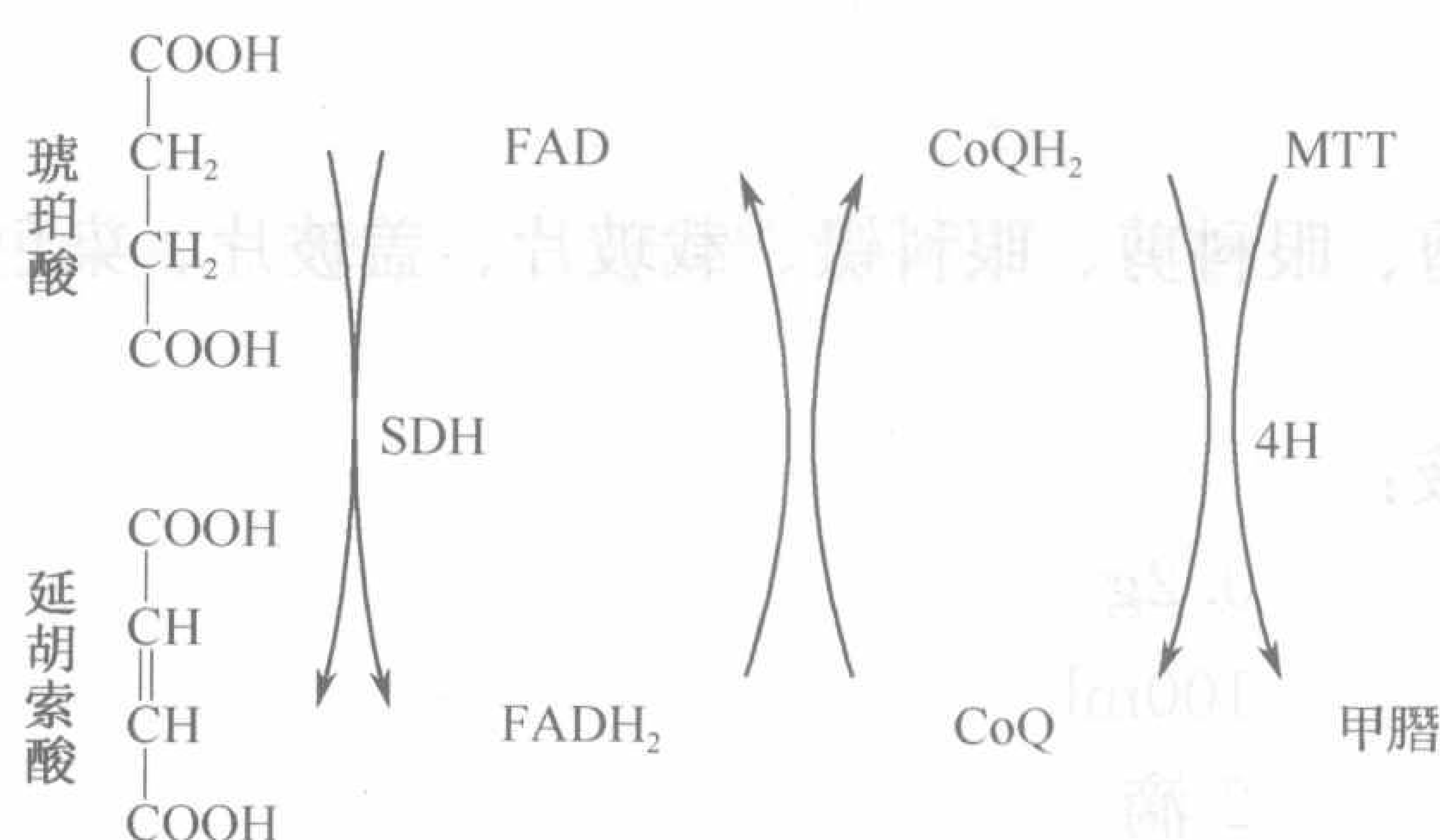


图 3-19　琥珀酸脱氢酶反应原理

【实验用品】

1. 器材

超净工作台、CO_2 培养箱、倒置相差显微镜、滴管、吸管、移液管、培养皿、96 孔培养板、试管架、恒温水浴锅、20μl 微量加样器、酶标仪。

2. 试剂

（1）1/15mol/L PPS（pH7.4）

A 液：KH_2PO_4 4.5365g 加双蒸水至 500ml

B 液：$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 1.193 85g 加双蒸水至 500ml

18.0ml A 液加 82.0ml B 液即为 pH7.4 的 PBS。

（2）MTT 溶液：25mg MTT 溶于 pH7.4 的 PBS 5ml 中，过滤除菌。

（3）阿霉素 2mg/ml。

（4）0.25%胰酶、1640 培养液、小牛血清、庆大霉素。

3. 材料

体外培养的肝癌细胞。

【方法与步骤】

设正常对照组和 3 个不同剂量药物（阿霉素）处理组（正常对照组除不加药物外其余均与加药实验组同样处理）

（1）细胞传代：将贴壁生长的肝癌细胞用 0.25%胰酶消化终止后，调整细胞密度为 5×10^4 个/ml，以每孔 100μl 接种于 96 孔板 A、B、C、D 四排孔内，每排 6 个复孔，待细胞培养至指数生长期时加药。

（2）药物终止前 4h，于各孔加入 5mg/ml MTT 20μl，将培养板放回 37℃ CO_2培养箱继续培养 4h（细胞在 SDH 作用下把黄色 MTT 还原成紫蓝色结晶）。

（3）吸弃培养液，各孔加入 100μl DMSO，将培养板振荡 10～20min。

（4）用酶联仪测定光密度，通过与对照组值的比较得到实验组的存活比率。

【观察与结果】

（1）加 MTT 4h 后，倒置相差显微镜下观察可见黄色的 MTT 被还原成紫蓝色颗粒，加 DMSO 后紫蓝色颗粒溶解。

（2）各组 OD 值取均值后，以下式计算存活细胞百分数：

存活细胞%＝（OD 实验/OD 对照）×100%（以空白组 OD 值调零）

例如，下表是某次实验 96 孔板测得的光密度值数据

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.339	0.355	0.358	0.337	0.346	0.377						
B	0.306	0.268	0.307	0.282	0.283	0.296						
C	0.18	0.272	0.238	0.219	0.168	0.098						
D	0.14	0.087	0.066	0.151	0.079	0.164						

A 排为正常对照组，6 个复孔的平均值为 0.3520±0.0469

B 排为低浓度药物实验组，6 个复孔的平均值为 0.2903±0.0153

C 排为中浓度药物实验组，6 个复孔的平均值为 0.1958±0.0611

D 排为高浓度药物实验组，6 个复孔的平均值为 0.1145±0.0420

相对于正常对照组细胞，低浓度药物实验组的细胞存活率为 0.2903/0.3520×100%＝82.47%

相对于正常对照组细胞，中浓度药物实验组的细胞存活率为 0.1958/0.3520×100%＝55.63%

相对于正常对照组细胞，高浓度药物实验组的细胞存活率为 0.1145/0.3520×100%＝32.53%

（邵红莲）

3.3　免疫细胞化学

免疫细胞化学是将免疫学基本原理与细胞化学技术相结合的技术，根据抗原与抗体特异性结合的特点，检测细胞内某种多肽、蛋白质及膜表面抗原和受体等大分子物质的存在与分布。目前来标记抗体与抗原结合的方式主要有两种：①直接法，用标记抗体与

相应的抗原直接结合，操作方法简便，特异性高，但敏感性较差，此法可用于检定未知抗原；②间接法，先用未标记的具有特异性的第一抗体与样品中的相应抗原结合，然后再以标记的第二抗体与特异性的第一抗体结合。通过这样的放大作用，使抗原分子上的标记物大大增多，所以间接法具有很高的敏感性，故应用更为广泛。如实验中常用的亲和素-生物素-过氧化物酶复合物（avidin-biotin peroxidase complex，ABC）技术。

用 ABC 方法来鉴定体外培养的小鼠星形胶质细胞

【实验原理】

亲和素具有 4 个同生物素亲和力极高的结合点，二者可牢固结合成不可逆的复合物，即先按一定比例将亲合素与酶标生物素结合在一起，形成亲合素-生物素-过氧化物酶复合物（ABC 复合物），标本中的抗原先后与一抗、生物素化二抗、ABC 复合物结合，最终形成晶格样结构的复合体，其中网络了大量酶分子，从而大大提高了检测抗原的灵敏度。

【实验用品】

1. 仪器与用品

镊子、吸水纸、湿盒、吸管、显微镜等。

2. 试剂

4%多聚甲醛溶液、0.1%Triton X-100 溶液、10%山羊血清、ABC 溶液、DAB 溶液、30%H_2O_2、甲醛、0.01mol/L PB 溶液、0.05mol/L TB 溶液。

3. 试剂配方

（1）4%多聚甲醛-0.1mol/L 磷酸缓冲液（pH7.3）配制方法：称取 40g 多聚甲醛，置于三角烧瓶中，加入 500～800ml 0.1mol/L 磷酸缓冲液（phosphate buffer，以下简称 PB），加热至 60℃左右，持续搅拌（或磁力搅拌）使粉末完全溶解，通常需滴加少许 1mol/L NaOH 才能使溶液清亮，最后补足 0.1mol/L 的 PB 于 1000ml，充分混匀。

（2）3%过氧化氢/甲醇：30%过氧化氢 100μl＋甲醇 900μl，现用现配。

（3）0.1% TritonX-100 溶液：把 40μl Triton X-100 溶入 40ml PBS 中，磁力搅拌 20min。

（4）DAB（diaminobenzidine）显色液：DAB 即 3，3-二氨基苯联胺 50mg，0.05mol/L TB 100ml，30%H_2O_2 30～40μl。配制方法：先以少量 0.05mol/L（pH7.6）的 TB 溶解 DAB，然后加入余量 TB，充分摇匀，使 DAB 终浓度为 0.05%，过滤后显色前加入 30%的 H_2O_2 30～40μl，使其终浓度为 0.01%。

（5）PBS 溶液：每升 PBS 含 NaCl 10g，KCl 0.25g，Na_2HPO_4 1.44g，K_2HPO_4 0.25g，调 pH 至 7.2，121℃高压灭菌 15min。

4. 材料

体外培养的小鼠神经细胞爬片。

【方法与步骤】

(1) 取细胞盖玻片，0.01mol/L PBS洗涤5min×1次；
(2) 4%多聚甲醛固定15min；
(3) 0.01mol/L PBS洗涤5min×3次；
(4) 加入0.1%TritonX-100通透10min；
(5) 0.01mol/L PBS洗涤5min×3次；
(6) 3%过氧化氢/甲醇（现用现配）作用5min；
(7) 0.01mol/L PBS洗涤5min×3次；
(8) 10%山羊血清封闭30min，勿洗；
(9) 加一抗（抗GFAP）4℃湿盒作用过夜或室温1～2h；
(10) 0.01mol/L PBS洗涤5min×3次；
(11) 生物素标记的二抗室温1h；
(12) 0.01mol/L PBS洗涤5min×3次；
(13) ABC作用20min；
(14) 0.01mol/L PBS洗涤5min×3次；
(15) DAB镜下染色；
(16) 蒸馏水冲洗2～3次，终止染色；
(17) 苏木精复染；
(18) 系列酒精脱水；
(19) 二甲苯透明；
(20) 中性树胶封片。

【观察与结果】

在显微镜下观察，阳性星形胶质细胞（GFAP）的胞质为深棕色，细胞核为深蓝色（图3-20）。

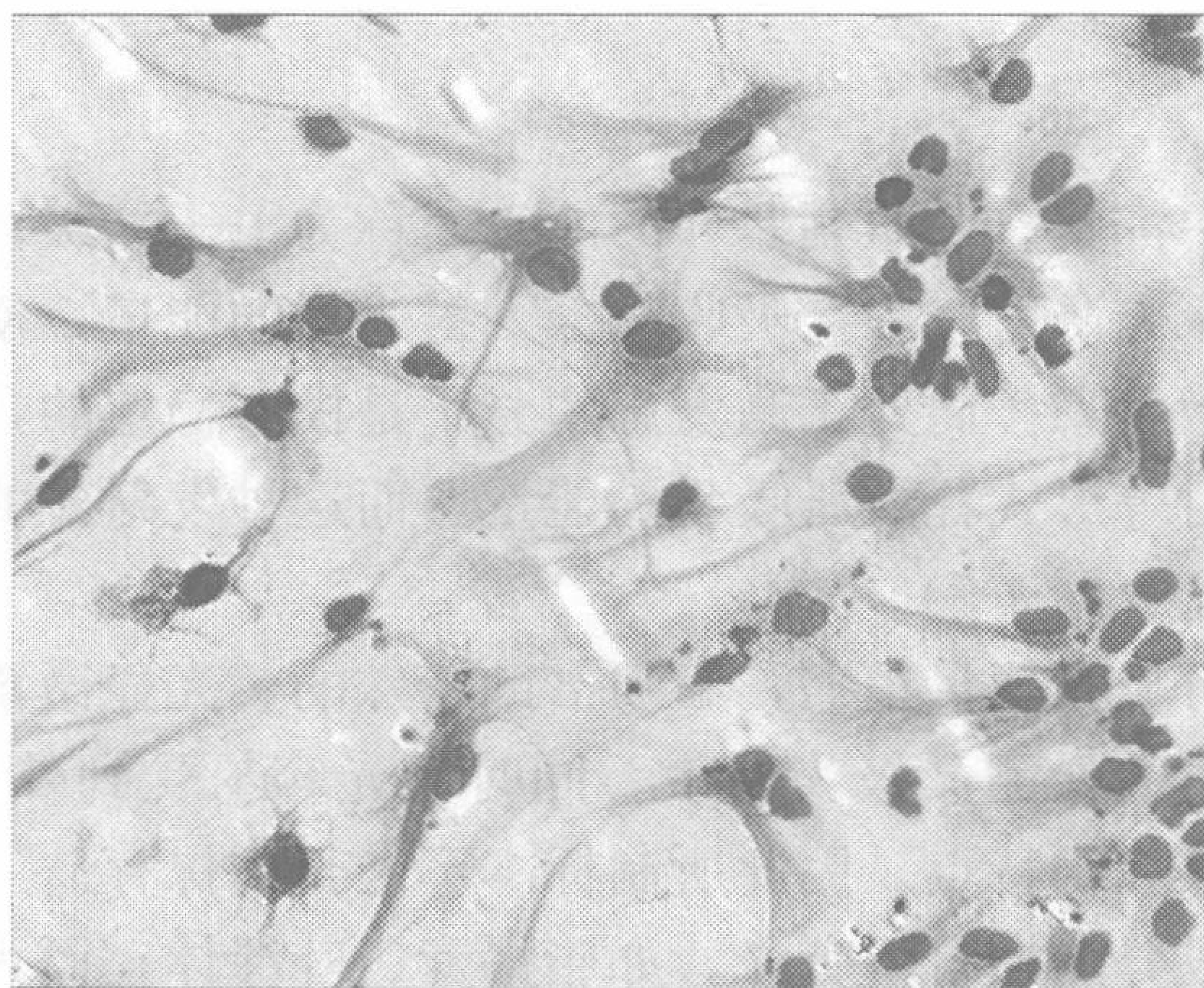


图3-20　体外培养的小鼠神经细胞爬片，显示星形胶质细胞（深棕色）

【注意事项】

(1) 用3%过氧化氢/甲醇消除内源性过氧化物酶活性，否则会产生非特异性染色。

（2）生物素制剂之间相互亲和性差异大，因此在应用ABC试剂时，应注意厂家和批号。ABC试剂保存温度以4℃为佳。

（3）一定要在显微镜下观察染色结果来决定DAB的显色时间。

（4）配置好的DAB要避光，DAB有致癌作用，故操作时应戴手套，尽量避免与皮肤接触，用后及时彻底冲洗。

（5）ABC溶液要在使用前30min配制好。

（王晓静）

3.4　荧光细胞化学与免疫荧光细胞化学

荧光细胞化学（fluorescence cytochemistry）是通过短波光激发细胞中荧光物质发射出可见荧光的方法，对细胞中特定物质进行定位、定性与定量研究的技术。免疫荧光细胞化学（immunofluorescence cytochemistry）是指通过免疫学中的抗原、抗体发生特异性反应形成抗原抗体复合物的原理，先将已知的抗体标记上荧光色素制成荧光标记物，即作为分子探针，通过应用短波光激发抗体上荧光物质发出的荧光对细胞中相应的抗原作定位、定性甚至定量研究的一项技术。荧光细胞化学技术伴随单克隆抗体技术、形态学技术、光学技术及电子计算机等技术的发展而不断发展。

利用荧光细胞化学技术可以识别定位各种细胞中成分，包括蛋白质、多肽、核酸、多糖、激素、病原体、受体、神经介质、肿瘤的标记物等。某些荧光染料和细胞中特定物质具有高亲和性，使该物质发出荧光。一般认为凡具有抗原性或半抗原性物质都可以用免疫荧光细胞化学方法检查并显示出来，该方法具有特异性强、灵敏度高、定位准确和简便快速等优点，并且能够与细胞形态及生命活动结合起来，在细胞生物学、神经生物学、免疫学、肿瘤学等学科中发挥着重要的作用。

【荧光细胞化学原理】

1. 荧光的产生

每种物质的分子中都具有一系列紧邻的能级，称为电子能级，电子在其相应的能级中运动。物质受高能量光照射时，会吸收部分入射光子的能量，使电子从低能级向较高能级跃迁，变成电子激发态。而处于激发态的分子是极不稳定的，其中的高能电子会返回基态，同时以光辐射等形式释放所吸收的能量，而这种发射光的波长大多处于可见光范围，此种光就是荧光（图1-5）。

荧光物质发出的可见光能量很弱，必须借助特殊的荧光显微镜，在暗视野下才能观察到，但对于待测物质的检测又极为灵敏。同时荧光容易受到外部光照、pH、溶剂等因素的影响，具有易淬灭的特点，因此所制标本不能长期保存。

细胞内只有极少成分能够自发荧光，如脂褐素、叶绿体；而大多数成分需要通过与荧光探针的结合将其转化为荧光物质而显示出荧光，此过程就是荧光标记。

2. 荧光色素

荧光色素是指能通过吸收激发光的光能产生荧光并能作为染料使用的有机化合物。

有些荧光色素可直接与欲显示的细胞中物质以特异性的高亲和力结合，使之发出荧光，如吖啶橙与DNA及RNA有特异性亲和力；有些荧光色素结合于抗体后可以用来检测相应抗原，如异硫氰酸荧光素（FITC）。不同荧光染料具有不同的最大吸收波峰和最大发射波峰，从而可发射出不同颜色的荧光。目前用于标记抗体或直接结合待测物质的荧光染料主要有FITC、四甲基异硫氰酸罗丹明（TRITC）、DAPI、Alexa Flour系列、Cy3、Cy5等。

3. 荧光色素标记抗体

免疫荧光细胞化学方法中所使用的分子探针是将已知的抗原或抗体标记上荧光色素制成的荧光标记物，再用这种可发出荧光的分子探针进行待检测物质的定位、定性和定量研究。因在细胞中待测抗原与其特异性抗体形成的抗原抗体复合物上含有荧光素，利用荧光显微镜观察标本，荧光色素受激发光的照射就会发出明亮的荧光（常用绿色或红色荧光），从而确定抗原或抗体的性质、定位，以及利用定量技术测定含量。

4. 荧光显微镜

荧光物质发出的荧光能量非常弱，必须借助荧光显微镜才能观察到。荧光显微镜结构主要由光源、滤片系统、光学系统等结构组成（图1-7）。

（1）光源：荧光必须由高能量的短波光（紫外光或蓝紫光）激发产生，荧光显微镜一般采用200W的超高压汞灯作光源，能够发射丰富短波光，足以激发各类荧光物质。高压汞灯有一定的使用寿命，打开高压汞灯后不可立即关闭，以免水银蒸发不完全而损坏电极；关闭汞灯后也不能马上开启，应待灯泡温度降低后再重新开启，一般均需要等待15～30min。

（2）滤片系统：滤片系统包括激发滤片和阻断滤片。不同激发滤片组只允许特定波长范围的激发光（如紫外光、蓝光或绿光）通过，阻止光源发出的其他光。经滤波选择后的激发光光路上设置有一个45°放置的反光镜（二向色镜），可将激发光折射后经物镜到达标本，激发出的荧光——发射光伴随激发光再通过物镜，到达反光镜，在此波长较长的荧光透过反光镜，经过阻断滤片组的滤波作用，到达目镜的只有荧光，其他光被阻断。由于荧光显微镜产生的是暗视野，使得荧光在暗背景上呈现好的反衬度，更易于观察。滤色片（包括激发滤片和阻断滤片）的选择和搭配与荧光色素的选择最好匹配，才能得到最接近真实的结果和最佳拍摄效果。

（3）光学系统：现在常用荧光显微镜光学系统的特点是采用落射光和暗视野。落射光的优点是所采用的反光镜具有分光滤镜的作用，短波光遇滤镜镀膜而反射，长波光则能垂直射向物镜，激发标本。由于暗视野聚光器等部件只允许荧光进入目镜，所以形成了黑色背景，使荧光鲜明，提高了灵敏度、清晰度和舒适感。

【免疫荧光细胞化学常用方法】

用蛋白质、多糖、病原微生物等大分子抗原物质多次免疫动物后，动物体内就会产生相应的特异性抗体（免疫球蛋白Ig），将抗体从血清中分离出，就是一抗；一抗也可通过单克隆抗体技术得到。用一抗免疫动物后获得的抗免疫球蛋白的抗体称为二抗。用荧光素标记抗体示踪或检查相应抗原的荧光抗体法较为常用。

常用的免疫荧光细胞化学包括直接法、间接法和双重免疫荧光标记法。

1. 直接法

用已知特异性抗体与荧光素结合，制成荧光特异性抗体，直接与细胞中相应抗原结合，在荧光显微镜下即可观察到待检抗原存在的部位呈现特异性荧光。此法很特异和简便，但一种荧光抗体只能检查一种抗原，灵敏性较差（图 3-21）。

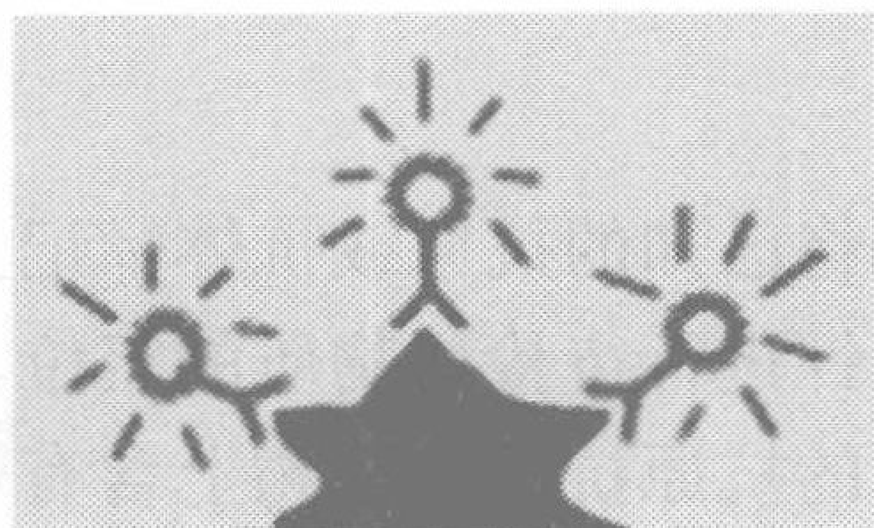


图 3-21　直接法

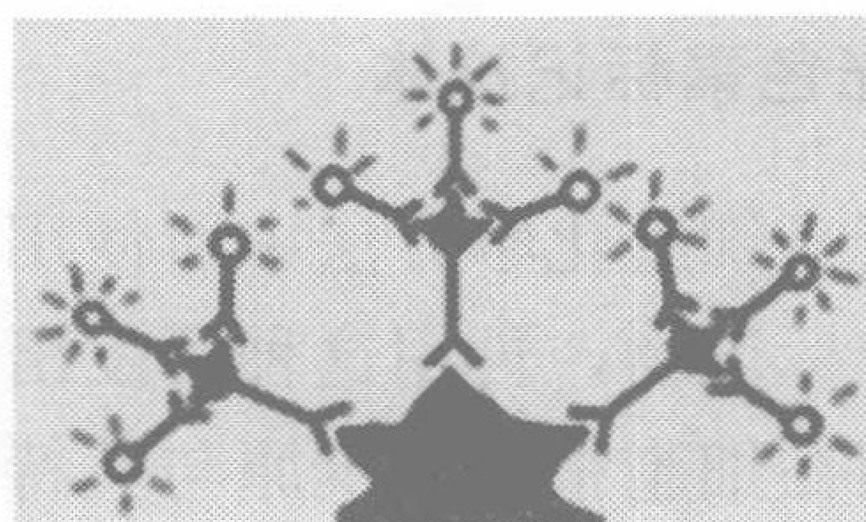


图 3-22　间接法

2. 间接法

此法是直接法的重要改进，是将荧光素标记在具有抗原特异性抗体的抗体（即第二抗体）上，待第一抗体与细胞中抗原结合后，再用标记了荧光素的二抗与一抗结合，从而显示待测抗原。因细胞抗原上每个分子结合 3～5 个分子抗体，当此抗体又可结合3～5个分子的荧光二抗，所以和直接法相比荧光亮度可增强 3～4 倍。此法除灵敏性高外，它只需要制备一种种属间接荧光抗体，就可以适用于多种第一抗体的标记显示。这是目前最广泛应用的技术（图 3-22 ）。

3. 双重免疫荧光标记法

在同一细胞中需要同时检测两种抗原时，就要进行双重荧光染色。该方法与以上直接法或间接法基本相同，所不同的就是一抗应选取不同种属来源的，如小鼠和兔来源的，二抗选取与相应一抗对应的不同颜色荧光素标记抗体。如抗 A 抗原的一抗选用小鼠来源的，二抗选用异硫氰酸荧光素标记的山羊抗小鼠抗体，发黄绿色荧光；抗 B 抗原的一抗用兔来源的，二抗选用四甲基罗丹明标记的山羊抗兔抗体，发红色荧光，可以在同一细胞中观察到 A、B 两种抗原的定位情况。如果两种一抗来自于同一种动物，可以选择不同的 Ig 亚型，IgG 和 IgM，或者 IgG1 和 IgG2a，二抗选用不同荧光素标记的抗体抗相对应一抗亚型（图 3-23）。

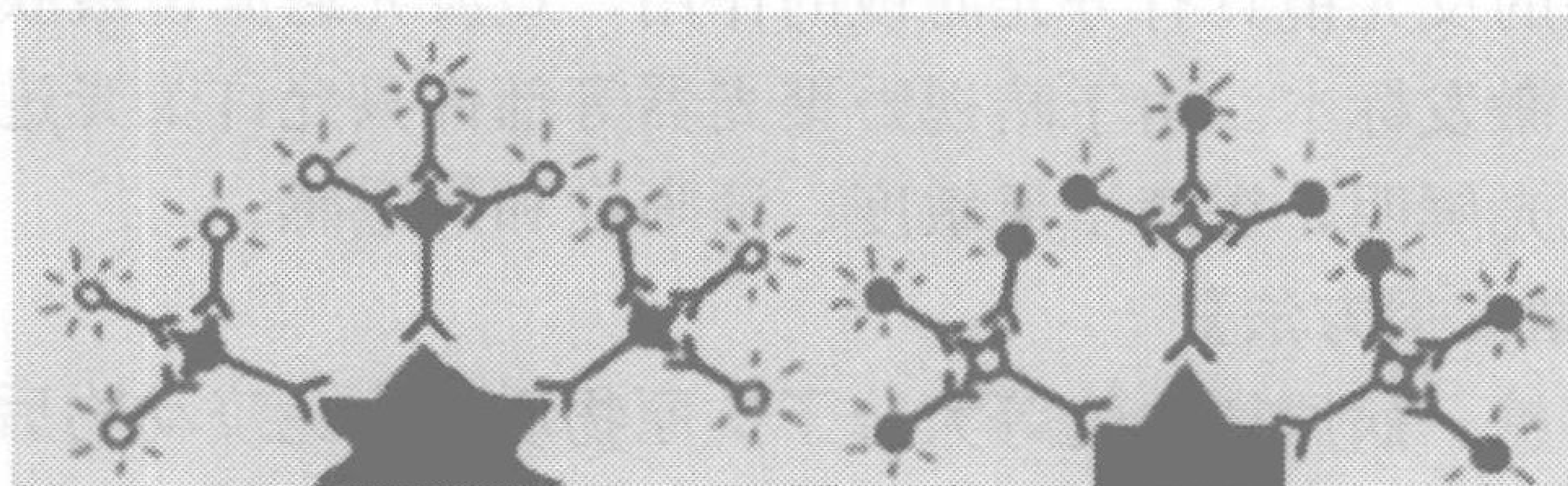


图 3-23　双重染色法

【注意事项】

1. 选择最佳固定与制片方法

免疫荧光细胞化学固定的原则是：在保持细胞形态和所测抗原完好的前提下，应采用浓度最低的固定液和最短的固定时间。固定时应注意：①取材后尽早固定，以免细胞形态和抗原的破坏；②固定后充分冲洗，避免固定液对后续反应的影响，如有些固定液可产生一定的非特异性染色；③根据实验目的、待测抗原和染色法选择最佳固定方法。

制片中根据培养的细胞是贴壁细胞还是悬浮细胞选择最佳固定方法，以防止细胞脱落。

2. 设立阳性和阴性对照组

设立阳性对照组用以验证染色方法的正确与否，即用已知的含靶抗原的细胞标本与实验组同样处理，结果应为阳性；阴性对照用以排除反应过程中产生的假阳性结果，如抗原抗体交叉反应或非特异性吸附等，包括空白对照和替代对照。前者是用缓冲盐洗液代替一抗，后者是产生一抗的动物的免疫前血清代替一抗，可排除待测细胞的阳性结果是由于抗体中混杂的动物血清导致的可能。

3. 选择抗体的最佳稀释度和孵育时间

选择最佳稀释度除了节省抗体外，更重要的是高浓度的抗体会导致非特异性荧光染色。对于间接法，一抗和二抗的最佳稀释度都应该筛选，最好利用棋盘法设定不同一抗和二抗的稀释度的搭配，找出细胞中荧光最亮，相对背景最暗的搭配应用；当然一抗的稀释度最为关键。一般用高效价抗体，湿盒内4℃孵育过夜，以增强特异性染色。

4. 消除非特异性染色

免疫荧光细胞化学染色时，由于部分荧光素之间形成聚合物、其他抗原与抗体的非特异性结合或抗体的非特异性吸附等原因可导致非特异性染色即“假阳性”的产生。抗体浓度过高容易导致假阳性的产生，所以首先考虑进一步稀释抗体；如果是由于一抗和二抗不纯，其中的非特异性抗体与细胞中某种成分形成免疫复合物造成的非特异性染色，可以将抗体稀释至一临界浓度，使非特异性染色为阴性而特异性染色呈阳性；同时一抗孵育后用缓冲液充分冲洗结合力较差的非特异性抗体；应在一抗孵育前用产生二抗动物的正常血清封闭非特异性结合位点。如果是双染标本，一抗二抗的选择应注意避免交叉反应。

（赵玲）

3.4.1 吖啶橙荧光染色法

【实验原理】

吖啶橙（acridine orange，AO）是最经典的极灵敏的荧光染料，它可对细胞中的DNA和RNA同时染色而显示不同颜色的荧光。其激发峰为492nm，荧光发射峰为530nm（DNA）、640nm（RNA），它与双链DNA的结合方式是嵌入双链之间，而与单链DNA和RNA则由静电吸引堆积在其磷酸根上。在蓝光（502nm）激发下，细胞核

发亮绿色荧光（约 530nm），核仁和胞质 RNA 发橘红色荧光（>580nm）。吖啶橙的阳离子也可以结合在蛋白质、多糖和膜上而发荧光，但细胞固定阻抑了这种结合，从而主要显示 DNA、RNA 两种核酸。

【实验用品】

1. 器材

荧光显微镜、牙签、载玻片、盖玻片、滴管、吸水纸。

2. 试剂

（1）0.1mol/L pH7.0 PBS 液

A 液：$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 2.76g，加蒸馏水至 100ml；

B 液：$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 5.36g 加蒸馏水至 100ml；

取 A 液 16.5ml＋B 液 33.5ml＋NaCl 8.5g，用蒸馏水稀释至 100ml。

（2）0.1％吖啶橙原液

0.1g 吖啶橙加蒸馏水至 100ml（临用时配制 0.01％吖啶橙染液：将 0.1％吖啶橙原液用 pH7.0 PBS 溶液稀释 10 倍）。

3. 材料

口腔黏膜上皮细胞临时制片或人肝癌 BEL-7402 细胞爬片。

【方法与步骤】

（1）取口腔上皮细胞涂在干净载玻片上。

（2）95％乙醇溶液固定 5min。

（3）滴加 0.01％吖啶橙染液染 5min。

（4）盖上盖玻片，吸水纸吸去盖玻片周围多余液体，镜下观察。

【结果与观察】

荧光显微镜下（选用蓝光激发滤片），可见含 DNA 的细胞核显示黄绿色荧光，含 RNA 的细胞质及核仁显示橘红色荧光（图 3-24）。

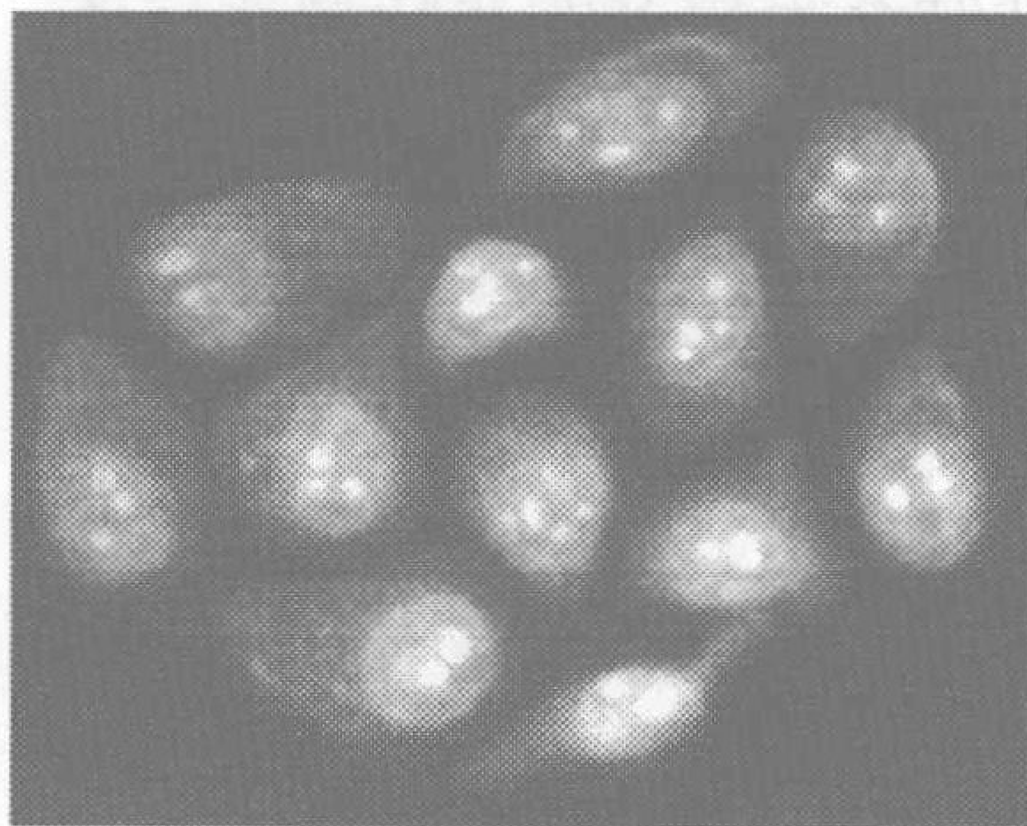


图 3-24 体外培养的肝癌细胞吖啶橙荧光染色

【注意事项】

（1）制片后一定要晾干玻片，再进行后续步骤，否则会导致细胞脱落。

（2）每种荧光染料，均有自己的最适 pH，此时荧光最强。当 pH 改变时，不仅荧光强度减弱，而且波长将有所改变，因此荧光检测时要在一定的 pH 的缓冲液中进行。

（赵玲）

3.4.2　间接免疫荧光细胞化学法显示细胞中的微管蛋白

【实验原理】

细胞骨架是维持真核细胞形态及参与一系列细胞生物学功能的重要细胞器，微管属于其中的重要成员，其中又以微管蛋白（tubulin）作为主要成分。细胞中的微管蛋白以网络状分布于胞质中，大多数细胞均呈高表达。采用人微管蛋白的单克隆抗体结合该抗原，再使用 FITC 标记的山羊抗小鼠二抗与一抗结合，最终细胞中的绿色荧光显示了目的抗原的存在。

【实验用品】

1. 器材

超净工作台、CO_2培养箱、倒置相差显微镜、研究型荧光显微镜、冰箱、微量加样器、移液管、吸管、细胞培养瓶、24 孔培养板、湿盒、试管架、眼科镊、培养皿、滤纸、载玻片、记号笔。

2. 试剂

（1）0.01mol/L PBS 溶液（pH7.4）：NaCl 8.0g，KCl 0.2g，Na_2HPO_4 1.15g，KH_2PO_4 0.2g，蒸馏水定容至 1000ml。

（2）抗体稀释液（含 BSA）。

（3）新配制的 4%多聚甲醛及 0.3%Triton X-100 PBS 溶液。

（4）5%正常山羊血清封闭液。

（5）0.5mol/L pH 9.5 碳酸盐缓冲液：$NaHCO_3$ 3.7g、Na_2CO_3 0.6g、双蒸水 800ml。

（6）碱性缓冲甘油溶液：碳酸缓冲液 1 份与甘油（试剂级，无荧光）9 份混合均匀。

（7）小鼠抗人 tubulin 的单克隆抗体（一抗）。

（8）FITC 标记的山羊抗小鼠的荧光二抗。

3. 材料

人肝癌 HepG2 细胞系细胞爬片。

【方法与步骤】

（1）从 24 孔培养板中取出培养的肝癌细胞爬片，PBS 冲洗 3～5min/次×3 次。

（2）吸弃 PBS，加入 4%多聚甲醛溶液固定细胞 10min。

（3）吸弃 4%多聚甲醛溶液，PBS 冲洗 3～5min/次×3 次。

（4）吸弃 PBS，加入 0.3%Triton X-100 PBS 溶液处理 10min。

(5) PBS 溶液冲洗 3min/次×3 次。

(6) 吸弃 PBS，用吸水纸吸去爬片上多余的液体，爬片细胞面向上，于其上滴加 5%正常山羊血清封闭液，将爬片放入湿盒，室温下封闭 1h。

(7) 用吸水纸吸去爬片上的封闭液，不冲洗爬片，在爬片上滴加大约 20～30μl 稀释好的抗 tubulin 一抗（稀释浓度需提前经过预实验选择好），在湿盒中置于 4℃孵育过夜。

(8) 吸取并回收一抗，用 PBS 冲洗 5min/次×3 次。

(9) 用吸水纸吸去爬片上的液体，在爬片上滴加 20～30μl 二抗稀释液（稀释浓度需提前经过预实验选择好），室温下于湿盒中避光孵育 1h。

(10) 吸弃二抗液体，用 PBS 冲洗 5min/次×3 次。

(11) 用吸水纸吸去爬片上的液体，滴加约 5μl 碱性甘油于载玻片上，将爬片上的细胞面向下盖于碱性甘油中，避免产生气泡，尽量排除玻片之间液体，封固后荧光显微镜观察。

【结果与观察】

肝癌细胞胞质中绿色荧光所在区域即为 tubulin 的存在部位，在 100 倍油镜下可以观察到 tubulin 呈绿色丝网状分布于胞质中（图 3-25）。

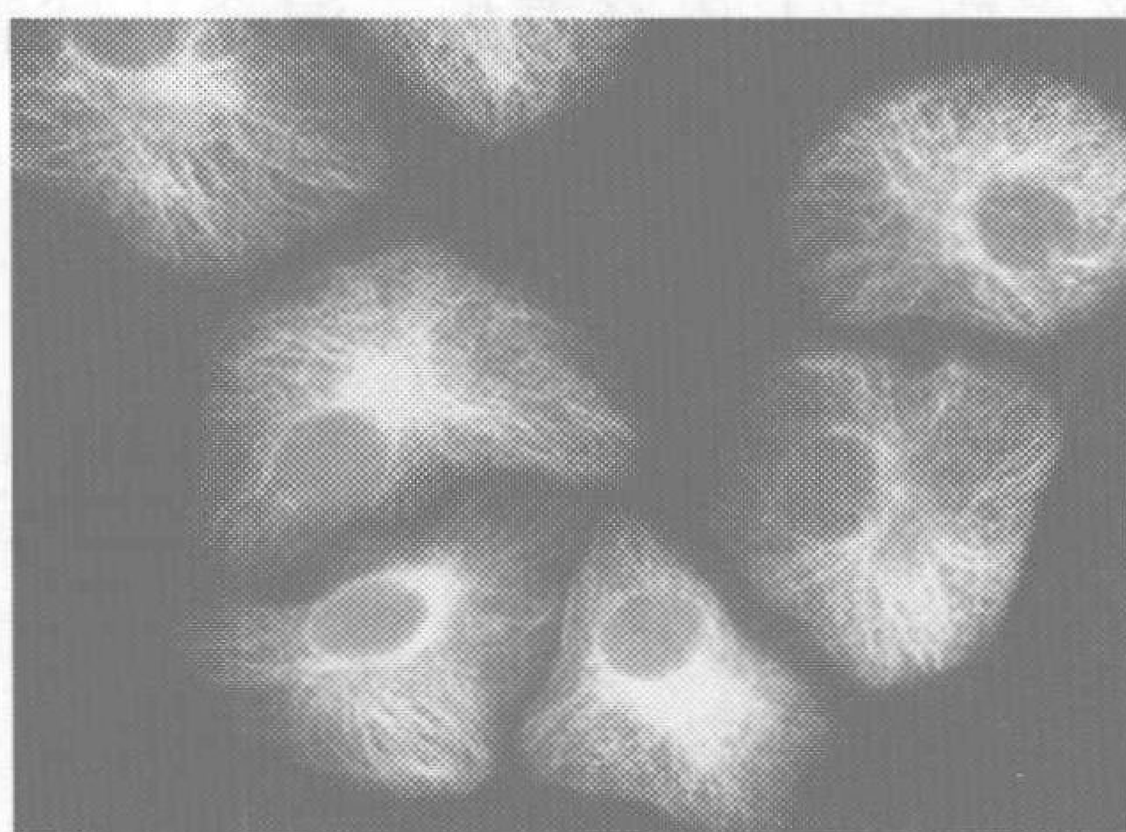


图 3-25　人肝癌 HepG2 细胞质中分布的微管蛋白纤维（绿色荧光所示）

【注意事项】

为了保证免疫荧光细胞化学染色的准确性，排除非特异性染色导致的假阳性结果，必须设立对照实验：①阴性对照：用 PBS 或非免疫的二抗动物血清代替一抗，再用以上方法进行染色，结果应为阴性；②阳性对照：用已知含有待测抗原的阳性细胞进行以上染色，结果应为阳性。

（赵玲）

3.4.3　用双重免疫荧光标记法鉴定体外培养的小鼠神经元和神经胶质细胞

【实验原理】

在同一培养细胞标本上需要同时检查两种抗原时（如 A 抗原和 B 抗原），要进行双重荧光染色，采用间接法，将两种一抗（如抗 A 抗体和抗 B 抗体）以适当比例混合，

加在标本上孵育后，洗去未结合的抗体，再用两种不同荧光素标记的二抗按适当比例混合，加在标本上孵育。抗A抗体的二抗用异硫氰酸荧光素（或CY2）标记，发黄绿色荧光；抗B抗体的二抗用TMRITC或CY3标记，发红色荧光，可以明确显示两种抗原的定位。

【实验用品】

（1）器材：镊子、吸水纸、湿盒、吸管、荧光显微镜等。

（2）试剂：4%多聚甲醛溶液、0.1%Triton X-100溶液、10%山羊血清、一抗、荧光二抗、0.01mol/L PBS溶液、DAPI溶液（1mg/ml）。

（3）材料：小鼠神经细胞爬片。

【方法与步骤】

（1）取细胞盖玻片，0.01mol/L PBS洗涤5min×3次。

（2）4%多聚甲醛固定15min。

（3）0.01mol/L PBS洗涤5min×3次。

（4）加入0.1%TritonX-100通透10min。

（5）0.01mol/L PBS洗涤5min×3次。

（6）10%山羊血清封闭30min，勿洗。

（7）加一抗（小鼠来源的Tuj1抗体和兔来源的GFAP抗体按不同比例混合），4℃潮湿环境下避光作用16～18h。

（8）0.01mol/L PBS洗涤5min×3次。

（9）荧光素标记的二抗［CY3标记的山羊抗小鼠IgG（H+L）和FITC标记的山羊抗兔IgG（H+L）按不同比例混合］37℃作用20min（或室温1h）。

（10）0.01mol/L PBS洗涤5min×3次。

（11）DAPI（1∶1000）室温作用5min。

（12）0.01mol/L PBS洗涤5min×3次。

（13）加含有抗淬灭的封片剂封片。

（14）荧光显微镜观察。

【观察与结果】

在倒置荧光显微镜下观察（图3-26）：发红色荧光的是Tuj1阳性的神经元细胞，发绿色荧光的是GFAP阳性的神经胶质细胞，DAPI使细胞核发出蓝色荧光。

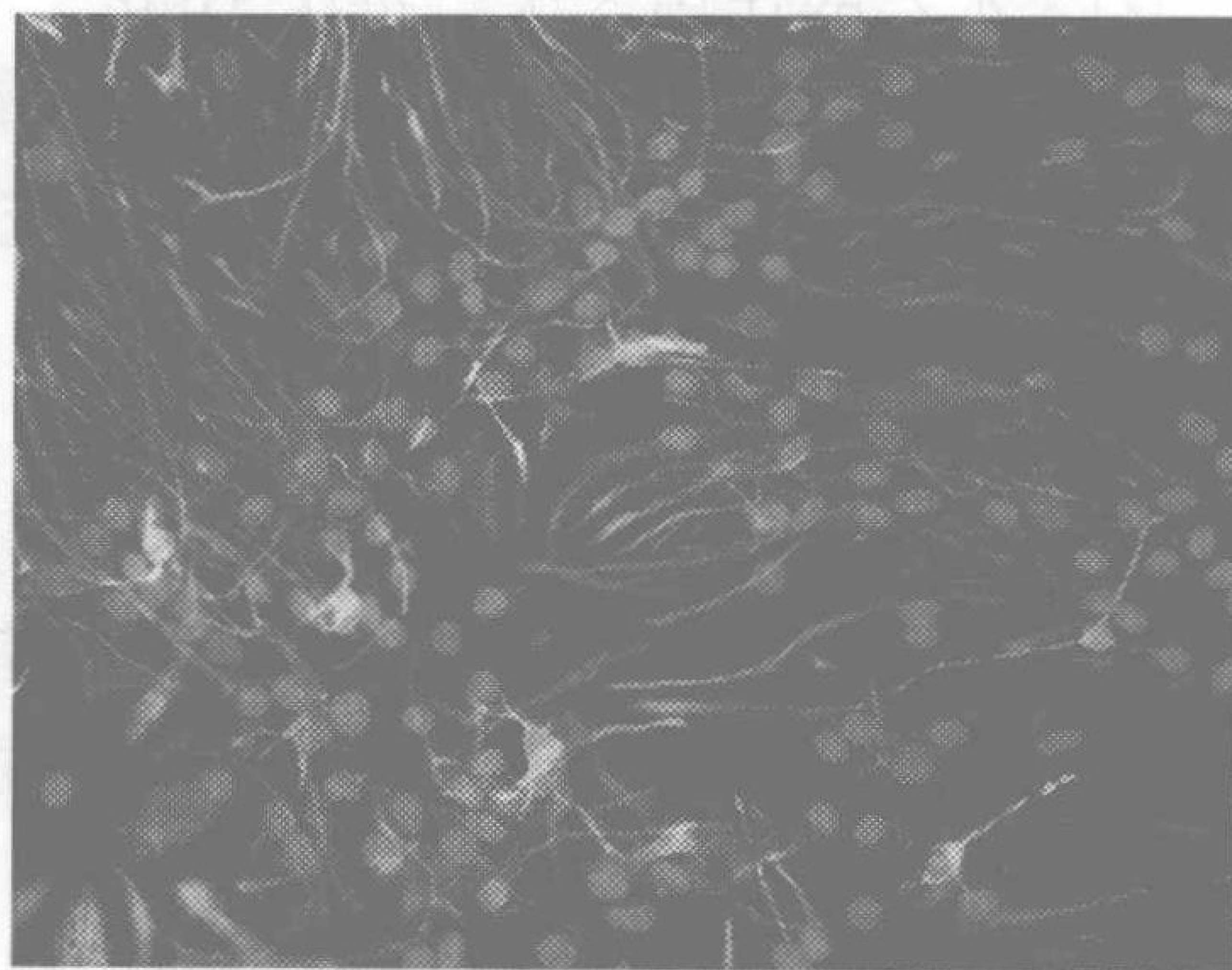


图3-26 双重免疫荧光标记的小鼠神经细胞（见彩图）

【注意事项】

（1）两种一抗应该是不同种属来源的。如一种是小鼠来源的，一种是兔来源的。

（2）加了荧光二抗以后的操作都要避光操作。

（3）荧光显微镜观察时要减少光线照射，防止荧光淬灭。

（4）封好的片子可在4℃冰箱保存，至

少一周。

(5) 为了保证免疫荧光细胞化学染色的准确性，排除某些非特异性染色，必须在初次试验时进行对照试验。标本自发荧光对照是标本只加 PBS 或不加 PBS 后封片，荧光显微镜观察应呈阴性荧光（无与特异性荧光相似的荧光）。阴性对照可用 PBS 代替一抗，荧光显微镜观察应呈阴性荧光。

（王晓静）

3.4.4 用双重免疫荧光法鉴定组织切片中的两种细胞的方法

【实验原理】

在同一组织切片标本上需要同时检查两种抗原时（如 A 抗原和 B 抗原），要进行双重荧光染色，采用间接法，将两种一抗（如抗 A 抗体和抗 B 抗体）以适当比例混合，加在标本上孵育后，洗去未结合的抗体，再把两种不同荧光素标记的二抗按适当比例混合，加在标本上孵育。抗 A 抗体的二抗用异硫氰酸荧光素（或 Cy2）标记，发黄绿色荧光；抗 B 抗体的二抗用 TMRITC 或 Cy3 标记，发红色荧光，可以在同一组织切片标本上明确显示两种抗原的定位。

【实验用品】

(1) 器材：镊子、吸水纸、湿盒、PAP 笔、微波炉、吸管、显微镜等。

(2) 试剂：4%多聚甲醛溶液、0.3%Triton X-100 溶液、1.5～3%山羊血清封闭液、抗原修复液、ABC 溶液、DAB 溶液、30% H_2O_2、甲醛、0.01mol/L PBS 溶液、二甲苯、100%、95%、70%、50%、30%梯度酒精、中性树胶。

(3) 材料：小鼠脑或胰腺组织的石蜡切片或者冰冻切片。

【方法和步骤】

(1) 把石蜡切片或冰冻切片放在温片台上加热，58℃ 30min（石蜡切片）或 40～50min（冰冻切片）。

(2) 在切片上标明所用的一抗名称、稀释度及日期。

(3) 石蜡切片脱蜡过程：(冰冻切片不需要)。

①在二甲苯里作用 3 次，每次 3min。

②无水乙醇作用 3 次，每次 1min。

③各在 95%，70%，50%，30%乙醇里作用 1min。

(4) 冰冻切片需要 4%多聚甲醛固定 30h（石蜡切片不需要）。

(5) PBS 洗 3 次，每次 5min。

(6) 抗原热修复（冰冻切片不需要）：

①在塑料罐中加入抗原修复液，把切片放入，在微波炉中加热 10min，使液体沸腾。

②从微波炉中取出塑料罐，让其在室温冷却 30～45min。

③把切片取出在蒸馏水中洗 3 次，每次 1min。

④PBS 洗 1 次，5min。

(7) 在 0.3%Triton X-100 溶液作用 2 次，每次 10min。

(8) PBS 洗 3 次，每次 5min。

(9) 把片子从 PBS 取出，吸干后用 PAP 笔把切片圈起来。

（10）加封闭液室温作用1h。

（11）倒掉封闭液加一抗（如小鼠脑组织切片用小鼠来源的GFAP抗体和兔来源的NG2抗体按一定比例混合）4℃作用过夜。

（12）PBS洗3次，每次5min。

（13）加二抗（Cy2标记山羊抗兔二抗和Cy3标记的山羊抗小鼠二抗按一定比例混合）室温作用1h。

（14）PBS洗3次，每次5min。

（15）DAPI（1∶1000）室温作用5min。

（16）0.01mol/L PBS洗涤5min×3。

（17）加含有抗淬灭的封片剂封片。

（18）荧光显微镜观察。

【观察与结果】

小鼠脑石蜡切片（图3-27）红色为GFAP阳性的星形胶质细胞，绿色为NG2阳性的少突胶质前体细胞，蓝色为DAPI染色的细胞核（低倍）。图3-28和图3-29分别为小鼠胰腺冰冻切片。

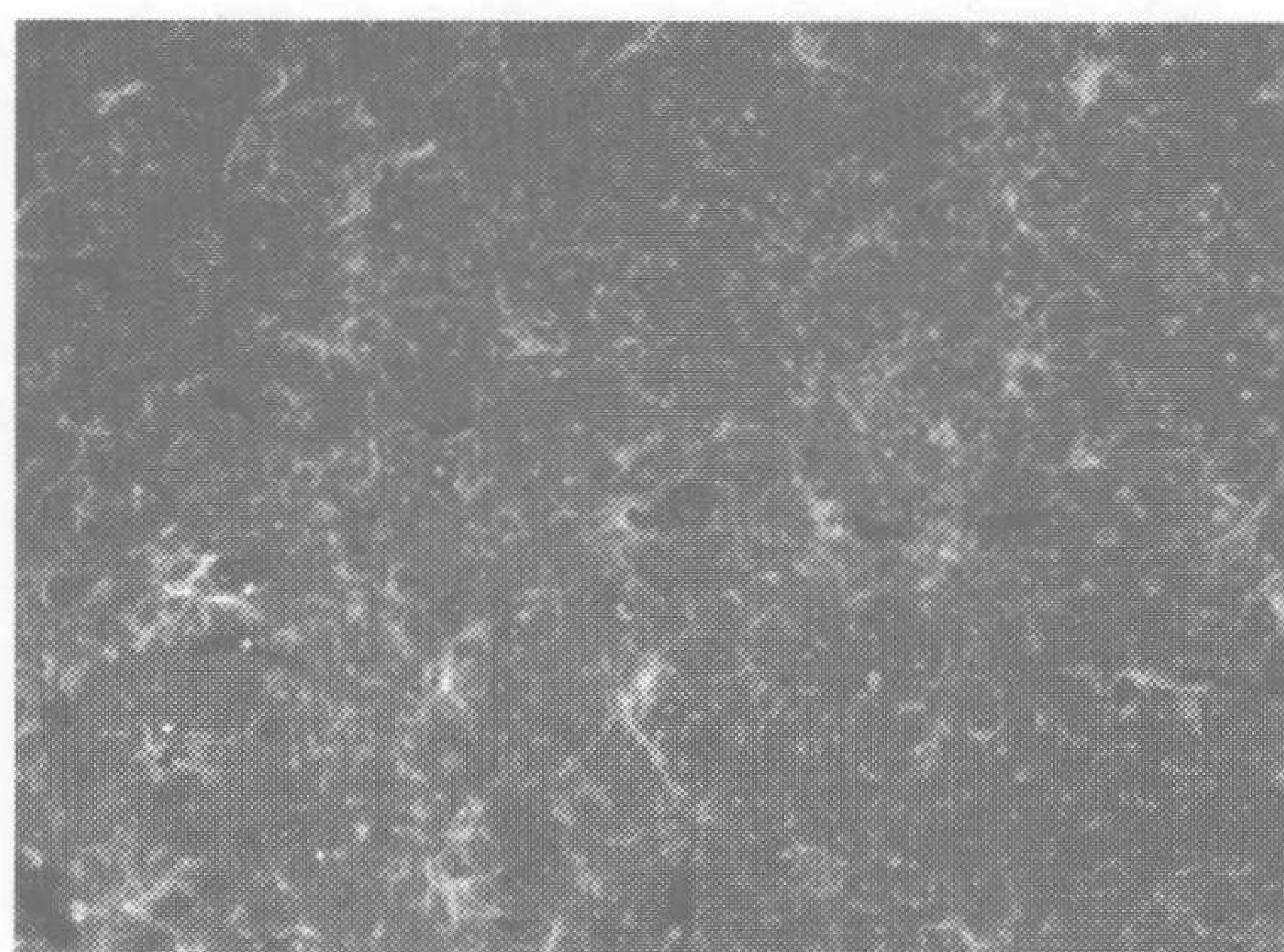


图3-27　小鼠脑石蜡切片显示星形胶质细胞（红色）和少突胶质前体细胞（绿色）

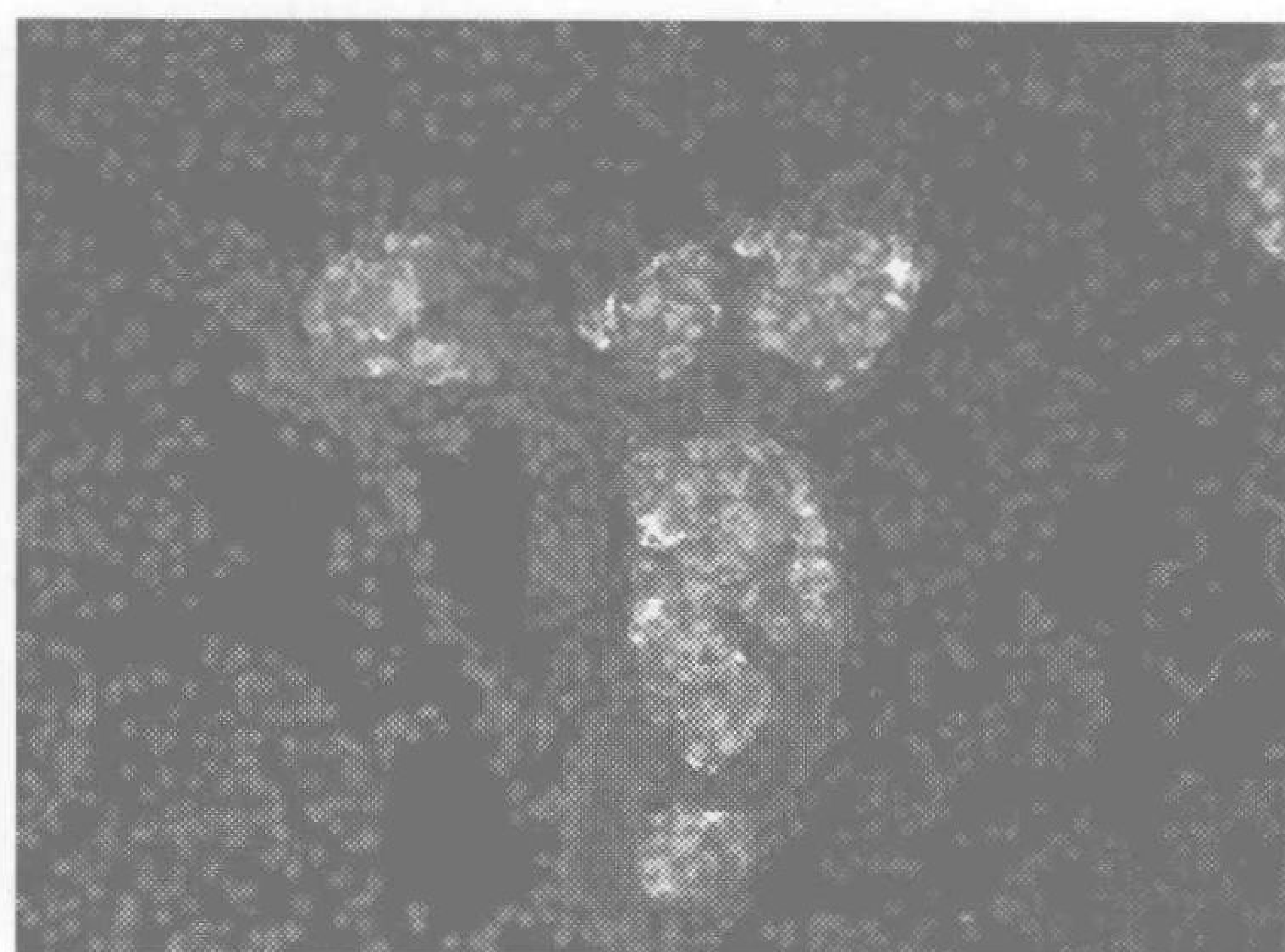


图3-28　小鼠胰腺冰冻切片，显示胰岛β-细胞（红色）和α-细胞（绿色），蓝色是DAPI显示的细胞核（照片由Dr. Qian Wang提供）

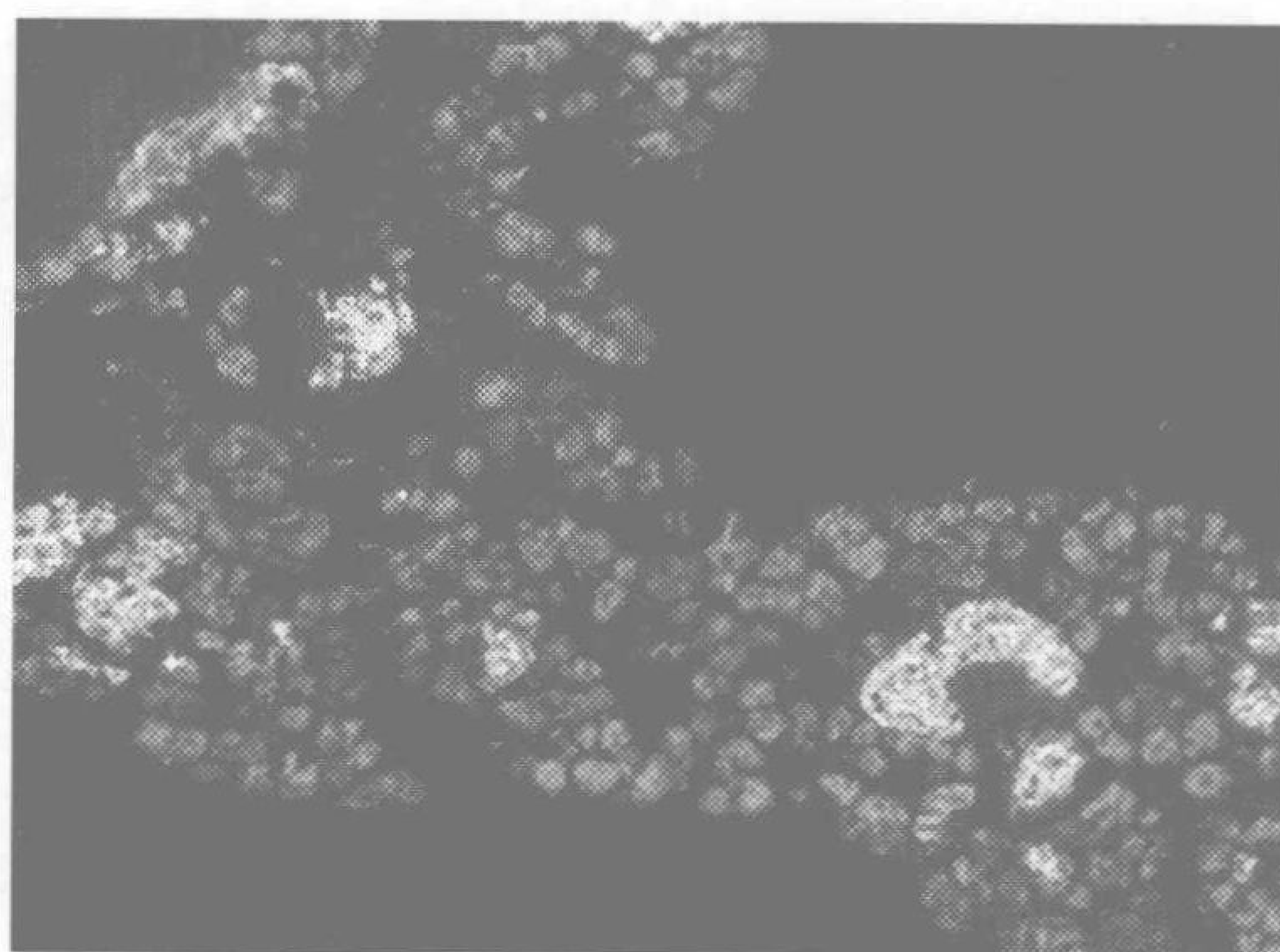


图3-29　小鼠胰腺冰冻切片，显示胰腺的外分泌细胞（红色）和胰岛的β-细胞（绿色）（照片由Dr. Qian Wang提供）

【注意事项】

同本章 3.4.3。

（王晓静）

参考文献

贲长恩，李叔庚. 2001. 组织化学. 北京：人民卫生出版社

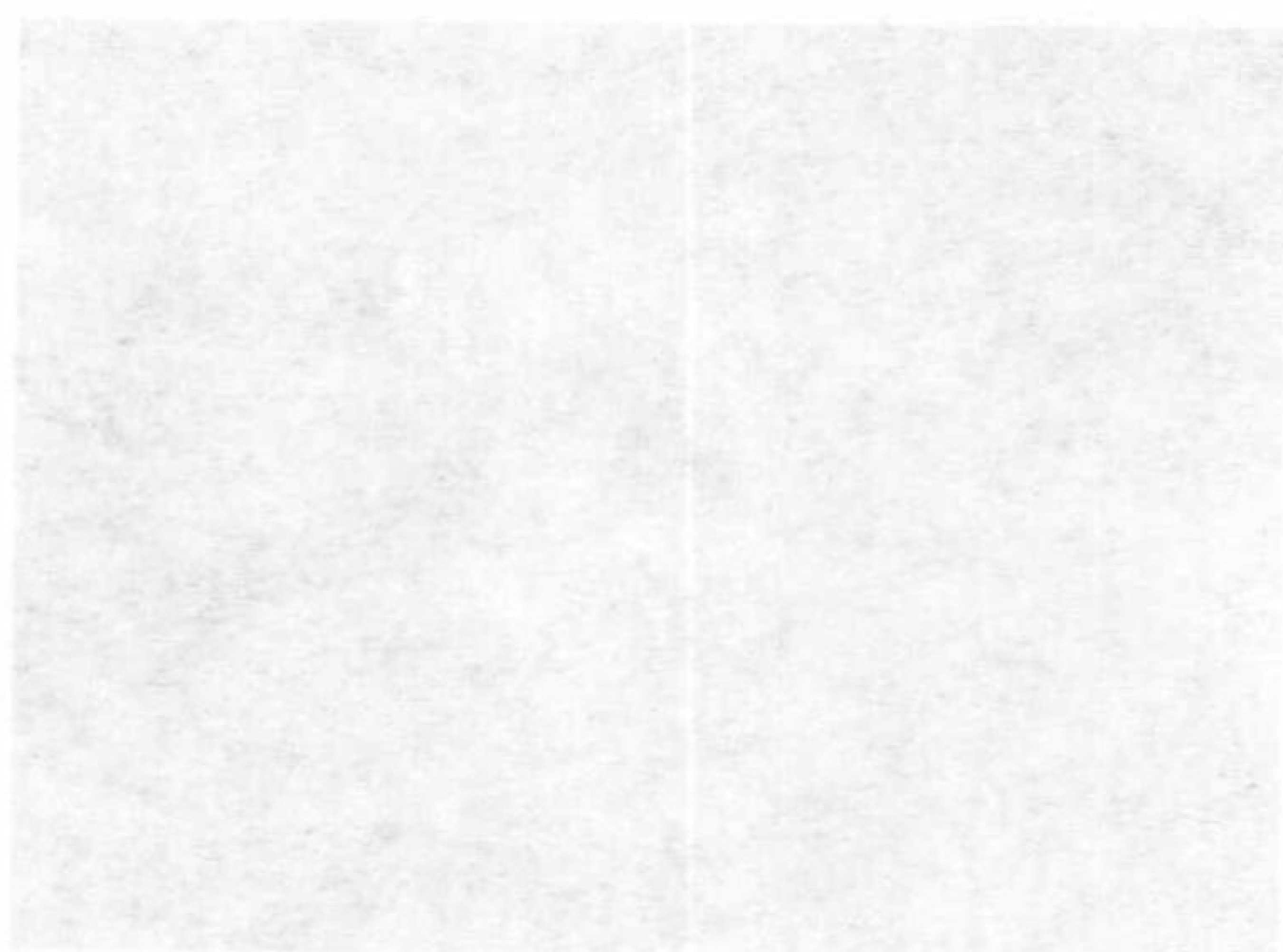
纪小龙. 施作霖. 1997. 免疫组织化学. 北京：军事科学出版社

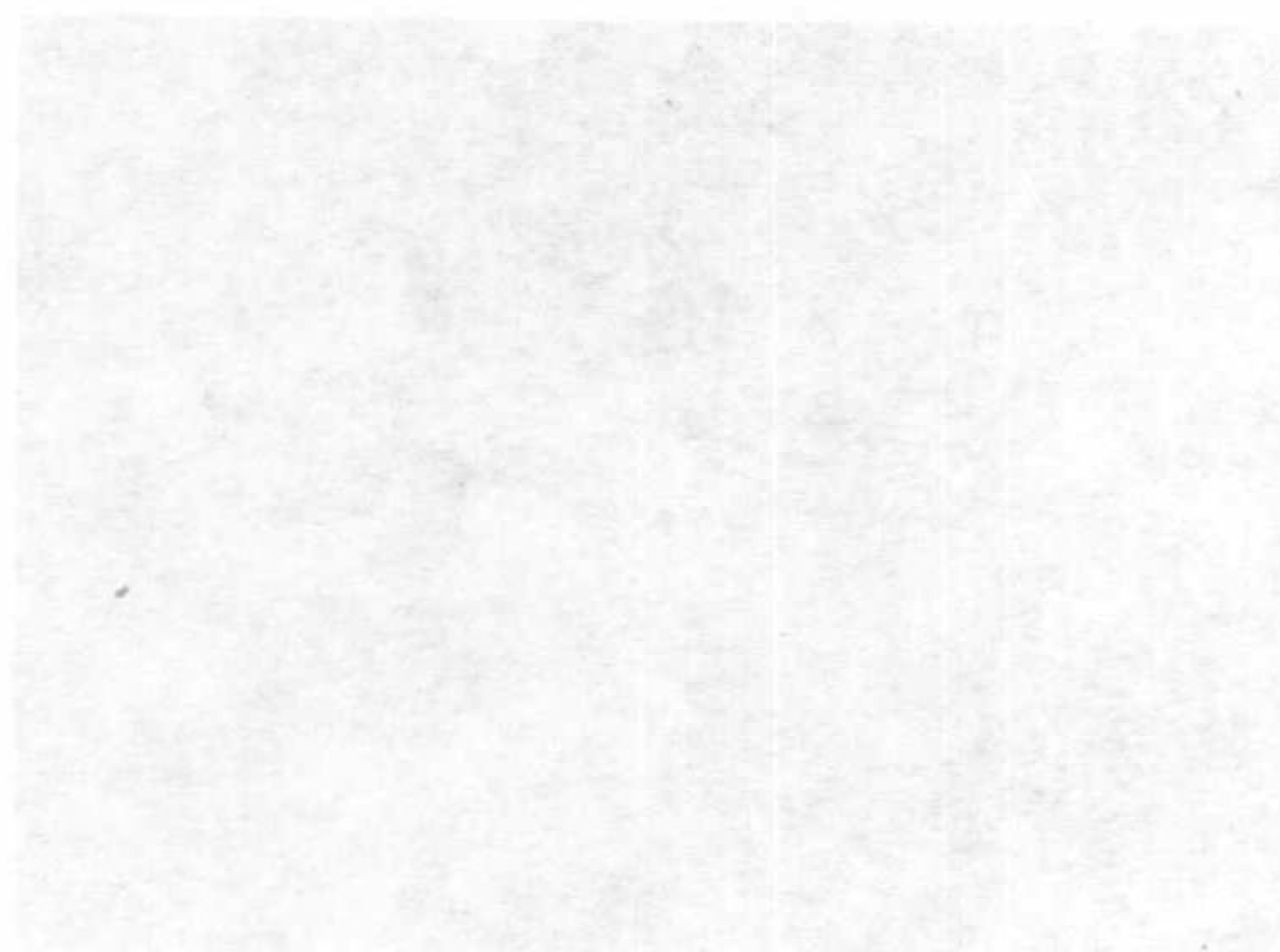
芮菊生，杜懋琴，陈海明等. 1980. 组织切片技术. 北京：高等教育出版社

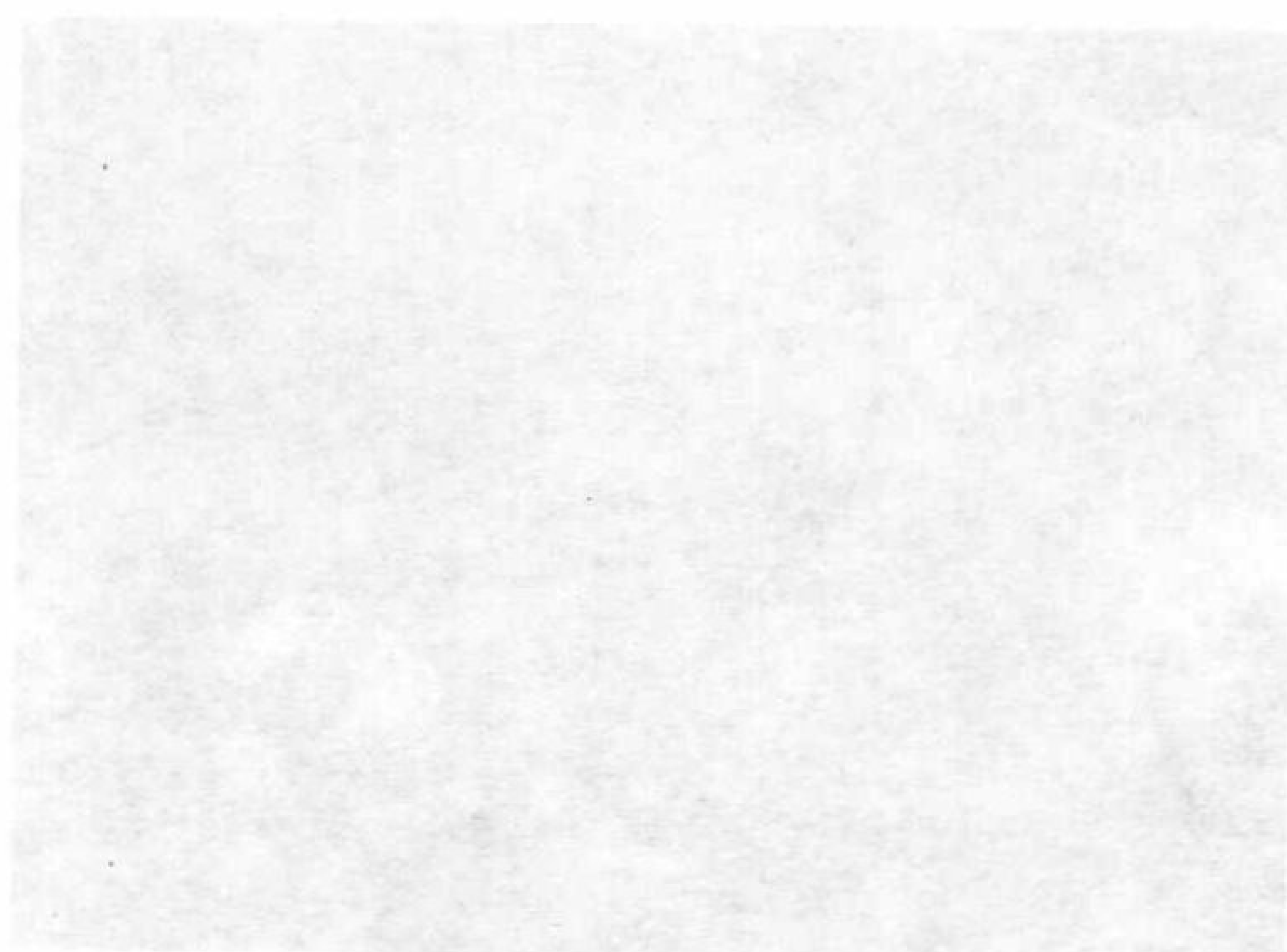
谢锦玉. 1998. 现代细胞化学技术及其在中西医药中的应用. 北京：中国古籍出版社

辛华. 2001. 细胞生物学实验. 北京：科学出版社

张锦生. 2003. 现代组织化学原理及应用. 第二版. 上海：上海科学文献出版社







第4章　细胞培养技术

细胞培养（cell culture）是指从生物体内取出组织或细胞，在体外模拟体内生理环境，在无菌、适当温度和一定营养条件下，使之生存、生长和繁殖，并维持其结构和功能的方法。从广义上讲，体外培养概念包括所有结构层次的培养，即器官培养、组织培养和细胞培养。实际上在体外培养时，无论采用什么方法和条件，培养的主要成分仍然是细胞。

由于体外培养的细胞其结构和功能接近体内情况，便于使用各种技术和方法进行研究，并能在较长时间内直接观察细胞生长、发育、分化过程中的形态和功能变化，而且可同时提供大量生物学性状相似的细胞作为研究对象，因此，细胞培养已经成为现代生命科学研究中一项非常重要的技术。但是，细胞培养作为一种研究技术也有其局限性，主要是细胞离体以后失去在体内与其周围环境的密切关系，其细胞生物学性质必然会发生某些改变，该因素也不可忽略。

近年来，细胞培养技术已广泛地应用于生物学的各个领域，如细胞生物学、分子生物学、遗传学、药理学、免疫学、细胞与组织工程、衰老生物学、肿瘤学和病毒学，以及临床学科基础研究，并取得了丰硕成果。

细胞培养不但是一门技术，而且是一门科学，具有基本理论、基本知识和基本方法。本章节中将重点介绍以下内容：细胞培养的基本原理与技术，细胞的原代培养和传代培养，培养细胞的一般观察方法，培养细胞增殖动力学方法和培养细胞的冻存技术以及几种特殊细胞的培养方法等内容。

4.1　细胞培养的基本原理与技术

细胞培养有专门的理论、技术和方法，要想更好地学习和掌握细胞培养技术，应该首先学习细胞培养的基本原理与技术。

细胞培养用品的清洗、培养用液的配制、除菌等均有严格的要求，特别是无菌操作，是细胞培养成败的关键。为此，本节将重点介绍体外培养细胞的生存条件、细胞培养常用设备和用品、培养用品的清洗与消毒、无菌操作基本要领和要求及细胞培养用液等。

4.1.1　细胞在体外生长的条件

细胞培养是一种程序复杂、要求严谨的实验技术。体外培养细胞所需要的生存条件和物质代谢过程与体内细胞基本相同，但随生存环境的改变也会出现一定的差异。要使细胞在体外长期生存，必须模拟体内环境，供给细胞存活所必须的条件，如水、无机盐、氨基酸、维生素、葡萄糖、生长因子（growth factor）等，还要受到温度、渗透压、pH 等多种因素的影响。

【内容与方法】

1. 水的质量

水对维持培养细胞的生命活动是十分重要的。在培养用液中任何对细胞有害的物质都会影响培养细胞的生存，因此要求培养细胞用液需用新鲜三蒸水或去离子水配制。

2. 无菌环境

防止污染是保证细胞在体外生存的基本条件之一。在培养环境中不得有细菌、病毒、支原体、真菌或其他微生物的存在，在细胞培养过程中要努力做到最大限度的无菌。要保持无菌环境，必须严格做到：细胞培养用品要经高压灭菌处理后才能使用，培养用液要经过除菌处理，实验过程要严格按照无菌操作规程进行。

3. 温度

适宜的温度是保证细胞在体外生存的重要条件，人和哺乳动物的细胞最适宜的培养温度为（36.5±0.5）℃，偏离这一温度范围细胞的正常代谢会受到影响，甚至死亡。一般来说，培养细胞对低温的耐受性比对高温要强。温度不超过39℃时，细胞代谢的强度与温度呈正比。培养温度高至41～42℃时，细胞只能生存很短的一段时间即行死亡。培养温度低至25～35℃时，细胞仍能生存和生长，但速度缓慢。细胞在4℃能存活数天。若温度降至冰点以下，则细胞可因胞质结冰而死亡。

4. 渗透压

人血浆渗透压大约是290mOsm/kg，可视为体外培养人细胞的理想渗透压。对大多数细胞来说，渗透压在260～320mOsm/kg范围都适宜。

5. pH条件

多数培养细胞的适宜pH为7.0～7.4，偏离此范围会对细胞产生有害影响。但各种细胞对pH的要求也不完全相同，一般情况下原代培养的细胞对pH的变动耐受差，连续性细胞系（株）耐受性强。但总的来说，细胞耐酸性比耐碱性大一些。HEPES是一种在pH7.2～7.6范围内缓冲力比较强的缓冲液，目前常用浓度是10mmol/L或20mmol/L。

6. 气体条件

细胞培养中O_2和CO_2是细胞生存不可少的条件之一。在体内O_2参与三羧酸循环可为细胞提供能量，但培养中的细胞常常可以进行糖酵解，因此大部分分散的细胞适合于低氧环境。CO_2既是细胞代谢产物，也是细胞所需成分，参与调节培养液的酸碱度。在动物细胞培养中，细胞代谢产生的CO_2不断释放到培养液内，导致培养液变酸，pH发生变动。通常在培养液中加入碳酸缓冲剂来维持培养液pH的恒定，但在开放培养时，缓冲剂$NaHCO_3$中的CO_2会迅速逸出，导致培养液变碱，影响细胞的生存。因此，开放培养常使用含5%CO_2浓度的培养箱来维持培养液恒定的pH。丙酮酸盐用于培养基

能使细胞增加内源性CO_2的产生，使它们不依赖于外源性CO_2和HCO_3^-，可用于保存活检组织样品。

7. 营养条件

体外培养的细胞所需营养必须从培养液中获取。当前在细胞培养中，广泛使用合成培养基，其主要成分由氨基酸、维生素、碳水化合物、无机盐和其他一些辅助物质组成。根据培养对象和目的不同，已设计出多种培养基，常用的有M199、RPMI 1640、Eagle's MEM、DMEM、F12、DMEM/ F12等。对于动物细胞来说，合成培养基只能维持细胞的生存，要想使细胞更好地生长和繁殖，还需要补充部分天然培养基，如各种动物血清、水解乳蛋白，以及胚胎浸出液等自制的体液或组织提取液体。

血清（serum）是体外培养中用得最多最广的天然培养基，在动物细胞体外培养中起着十分重要的作用，能为细胞提供生存、生长和增殖所必需的生长因子、细胞贴附和铺展的基质成分、载体蛋白、中和毒性物质、为培养液提供很好的缓冲系统及蛋白酶抑制剂等。胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）和小牛血清（fetal calf serum，FCS）应用最为广泛，通常在培养液中添加10%～20%的小牛血清。

无血清培养基（serum free medium，SFM）是化学成分明确的培养基，可以排除含血清培养时血清中许多未知因素的干扰，使培养结果更为可靠。目前常用的无血清培养液以基础合成培养基和添加替代血清的补充因子组成。补加的主要成分有激素、生长因子、细胞黏附蛋白、金属离子转移蛋白（转铁蛋白）、脂蛋白、脂肪酸、酶抑制剂和微量元素等。

8. 生长基质

体外培养细胞的生长，除少数悬浮型生长的细胞外，绝大多数细胞都需要黏附在固相表面才能生长，如玻璃和塑料培养器皿表面。一些不易贴壁的细胞，还可以采用在培养瓶、皿表面涂上一层生长基质物质，如多聚赖氨酸（polylysine）、胶原（collagen）、纤连蛋白（fibronectin，FN）、层粘连蛋白（laminin，LN）等，以促进细胞黏附和贴壁生长。

4.1.2　培养细胞常用设备和用品

1. 常用设备和仪器

（1）超净工作台（super clean bench）：是目前已普遍应用的无菌操作装置。其原理是利用鼓风机驱动空气通过高效空气微粒滤层净化后，徐徐通过工作台面，使工作面形成无菌环境（图4-1）。

（2）CO_2培养箱：是为培养细胞提供恒定温度的保温设备，同时还可以恒定供应一定浓度的CO_2，以维持培养液稳定的pH。培养细胞要使用培养皿或螺旋口培养瓶以及多孔培养板，以保证通气。箱内要保持清洁，定期用酒精擦拭或紫外灯照射消毒。箱内水槽内要添加足量的无菌蒸馏水，以维持培养箱内湿度，避免培养液蒸发。

（3）倒置相差显微镜（inverted phasecontrast microscope）：是细胞培养室最常用

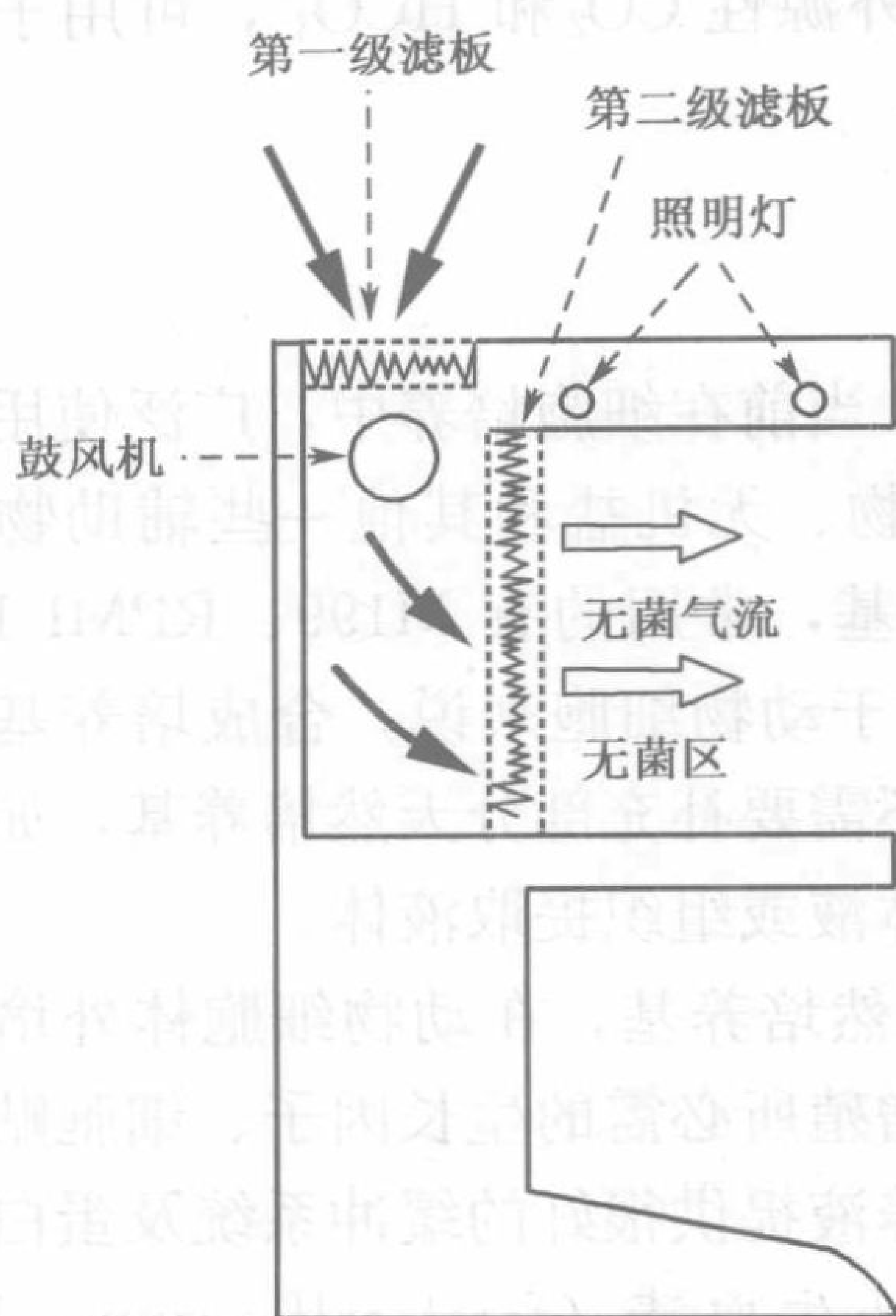


图 4-1　外流式净化工作台
黑箭头为未净化气流，白箭头为已净化气流

的设备。在培养过程中用来每天观察细胞生长、发育、增殖状况，并且可以通过配置的显微摄像装置随时拍照，记录细胞的生活状态。

(4) 冰箱：普通 4℃冰箱用来储存各种要使用的培养用液，如培养液、缓冲液、消化液、抗体等。−20℃或−80℃冰箱用来储存需要长期低温保存的血清、酶类、抗体等。

(5) 离心机：在细胞培养过程中用来洗涤收集细胞，制备细胞悬液。培养细胞离心速度一般在 1000r/min 左右。

(6) 电热干燥箱：主要用来烘干和干热消毒清洗过的玻璃器皿，如各种玻璃培养瓶、皿、容器、吸管、试管等。电热干燥箱在 50～300℃。

(7) 水纯化装置：纯水装置是制备细胞培养必备装置。细胞培养对水的要求极高，一般要使用三次蒸馏水或超纯水装置制备的超纯水配制各种培养用液。玻璃器皿的最后冲洗也要使用纯化水，或至少是双蒸水。

(8) 高压蒸汽消毒装置：常用于玻璃培养器皿、解剖器械、橡胶和布类用品以及三蒸水、不含糖的缓冲液的消毒。国产高压蒸汽灭菌器具有使用方便、价格便宜的特点。

(9) 过滤除菌装置：大多数培养用液中含有遇热不稳定的物质，可采用 0.1～0.2μm 孔径的滤器进行过滤除菌。过滤除菌器装置由过滤器和抽滤泵（正或负压）两部分组成。实验室常用的滤器有玻璃漏斗滤器和微孔滤膜滤器。玻璃漏斗滤器虽然清洗比较麻烦，但价格低廉，可反复使用。通常使用 500ml 或 1000ml 的 G6 玻璃漏斗滤器过滤培养用液。

目前国内实验室使用微孔滤膜滤器较为普遍，有一次性和反复使用的两类。滤器有效过滤量与滤膜的有效过滤面积有关，通常使用时要注意滤器（膜）的有效过滤面积，滤膜直径为 25mm 的针头加压式微孔滤膜滤器适宜于过滤 100ml 以下的少量液体，用注射器吸取待过滤的液体后，安装上针头滤器，推压液体滤过除菌。不锈钢微孔滤膜滤器常用来过滤细胞培养用液，按滤器容量分为 500ml、1000ml、2500ml 和 5000ml 四种规格，具有使用方便、经济实用的特点。目前市场上也可买到进口一次性塑料大滤器(1000ml)（图 4-2）。

(10) 天平：小型普通天平用来离心时平衡离心管之用。电子天平用来称量试剂，使用最多的是 0.1～1mg 的电子感量天平。电子天平使用前需要通电预热 20min，以保称量准确。

(11) 细胞冷冻储存装置：各实验室主要使用液氮容器储存细胞。常用的国产液氮容器有 35L 和 50L 两种规格，一般需要每两周补充一次液氮。液氮温度在−196℃，使用时切勿溅到皮肤上，以防引起冻伤。

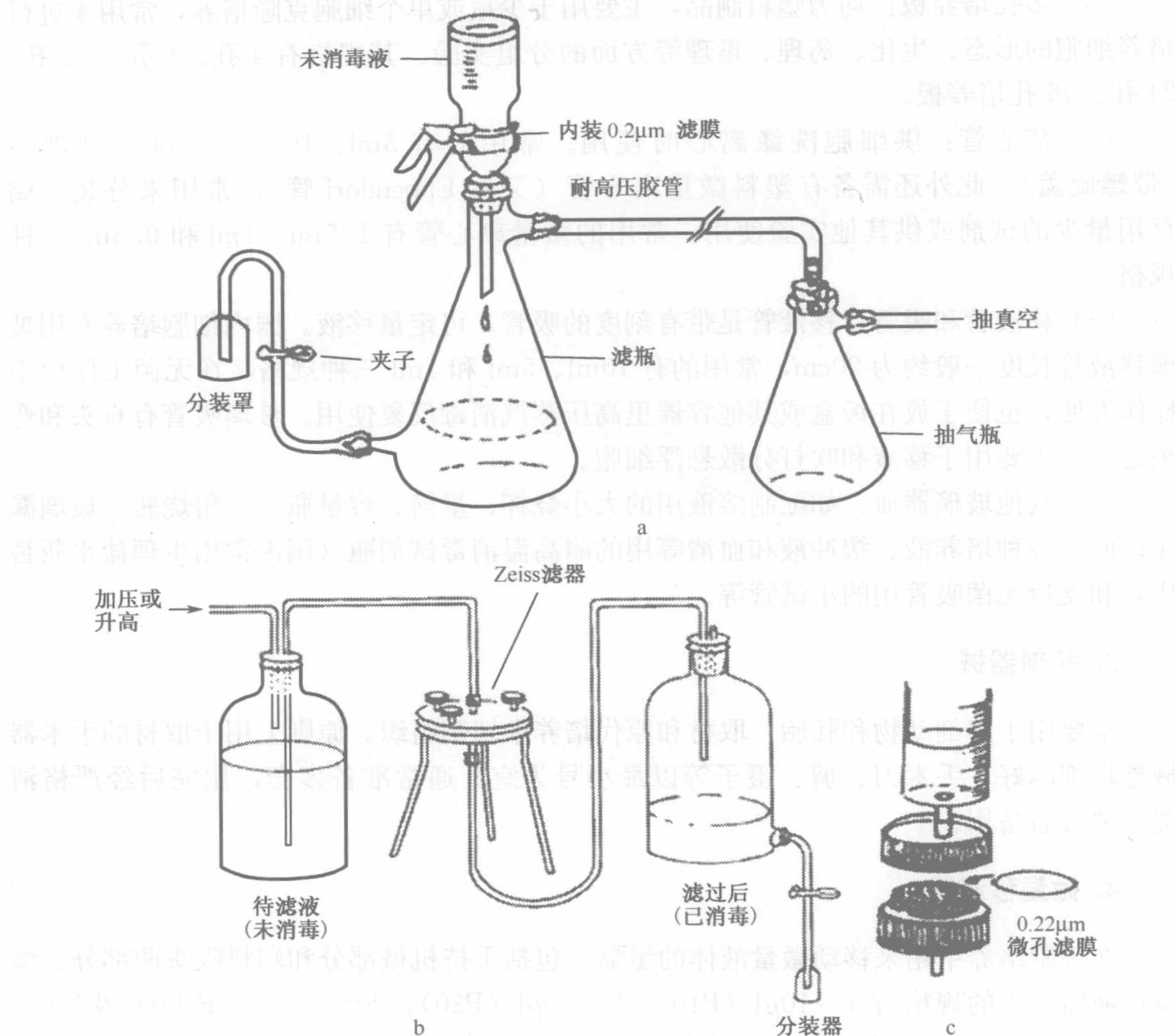


图 4-2　常用抽滤装置

a. 抽气过滤系统；b. 加压式不锈钢滤器；c. 微孔滤膜小滤器

2. 培养器皿

培养器皿有玻璃制品和一次性塑料制品两种。玻璃制品清洗、消毒后可以反复使用，使用价格比较便宜，被广泛采用。实验室中一般应备有至少三套以上数量的玻璃制品才能满足使用，即一套正在用于细胞培养；一套正在进行洗刷处理；一套消毒灭菌后备用。一次性塑料制品在出厂前已消毒灭菌，密封包装，使用方便。

(1) 培养瓶：主要用于培养、繁殖细胞。用无毒中性优质玻璃制成的玻璃培养瓶，有螺旋口和平口两种，螺旋口培养瓶适用于在 CO_2 培养箱中开放培养，平口培养瓶适用于胶塞密闭培养。培养瓶的规格一般指瓶壁细胞生长面的面积或培养瓶的容积。常用的有 $25cm^2$、$50cm^2$、$75cm^2$、$100cm^2$ 等规格。

(2) 培养皿：主要用于盛取、分离、处理组织，也可以用于细胞集落形成检测以及进行细胞显微操作等实验。用于细胞培养时必须使用 CO_2 培养箱培养。常用的规格按其直径可分为 15mm、30mm、60mm、100mm、150mm 几种。

(3) 多孔培养板：均为塑料制品，主要用于少量或单个细胞克隆培养，常用来进行培养细胞的形态、生化、药理、毒理等方面的分组实验。其规格有 4 孔、6 孔、12 孔、24 孔、96 孔培养板。

(4) 离心管：供细胞洗涤离心时使用。常用的有 5ml、10ml、50ml 三种规格（带螺旋盖）。此外还需备有塑料微量离心管（又称 Eppendorf 管），常用来分装、储存用量少的试剂或供其他实验使用。常用的微量离心管有 1.5ml、1ml 和 0.5ml 三种规格。

(5) 移液管和吸管：移液管是带有刻度的吸管，可定量移液。国内细胞培养专用玻璃移液管长度一般约为 20cm，常用的有 10ml、5ml 和 1ml 三种规格，在无菌工作台中操作方便，也便于放在饭盒或其他容器里高压蒸汽消毒反复使用。玻璃吸管有直头和弯头之分，主要用于移液和吹打分散悬浮细胞。

(6) 其他玻璃器皿：如配制溶液用的大小烧杯、量筒、容量瓶、三角烧瓶、玻璃漏斗；储存各种培养液、缓冲液和血清等用的耐高温消毒试剂瓶（国内常用生理盐水瓶替代）和支持无菌吸管用的小试管等。

3. 解剖器械

主要用于解剖动物和胚胎，取材和原代培养中切割组织。原则上用于取材的手术器械越精细越好，手术刀、剪、镊子等以最小号为宜。通常准备多套，用完后经严格清洗、消毒后备用。

4. 微量移液器

在细胞培养中用来移动微量液体的量器，包括手持机械部分和塑料吸头两部分。微量移液器常用的规格有 1～10μl（P10）、2～20μl（P20）、20～100μl（P100）及100～1000μl（P1000）等几个型号，可任意调节微量移液器规定范围内的某一个量。对每一种移液器都有各种规格的吸头与之匹配，吸头为一次性，需要消毒使用。多通道微量移液器有 8 个通道和 12 个通道的两型，适用于 96 孔培养板的工作，可同时向一排培养孔内加样或移出培养液。

4.1.3 培养用品的清洗

在培养环境中无毒、无菌是保证细胞在体外生存的必须条件，因此对培养器皿的清洗和消毒是极为重要的环节。培养用品的清洗和消毒工作有一套严格的程序，其完成的好坏直接影响到细胞培养的成败。

【基本原理】

培养用品的清洗

离体培养的细胞对任何有害物质都十分敏感，如细胞残余物、自来水中的铅离子、洗液中的铬离子和去污剂等。因此，在清洗各类玻璃器皿时，尤其是直接接触细胞的培养瓶、皿、培养瓶的胶塞和瓶盖等更需注意这一问题。

【方法与步骤】

1）玻璃用品的清洗

在细胞培养中，工作量最大的是玻璃器皿的清洗。清洗后的玻璃器皿不仅要求干净透明、无油迹，而且不能残留任何物质。某些化学物质仅百万分之一（1ppm）毫克就会对细胞产生毒性作用。因此，玻璃器皿的清洗必须严格按照程序进行。一般玻璃器皿的清洗包括浸泡、刷洗、浸酸、冲洗和干燥五个步骤（图4-3）。

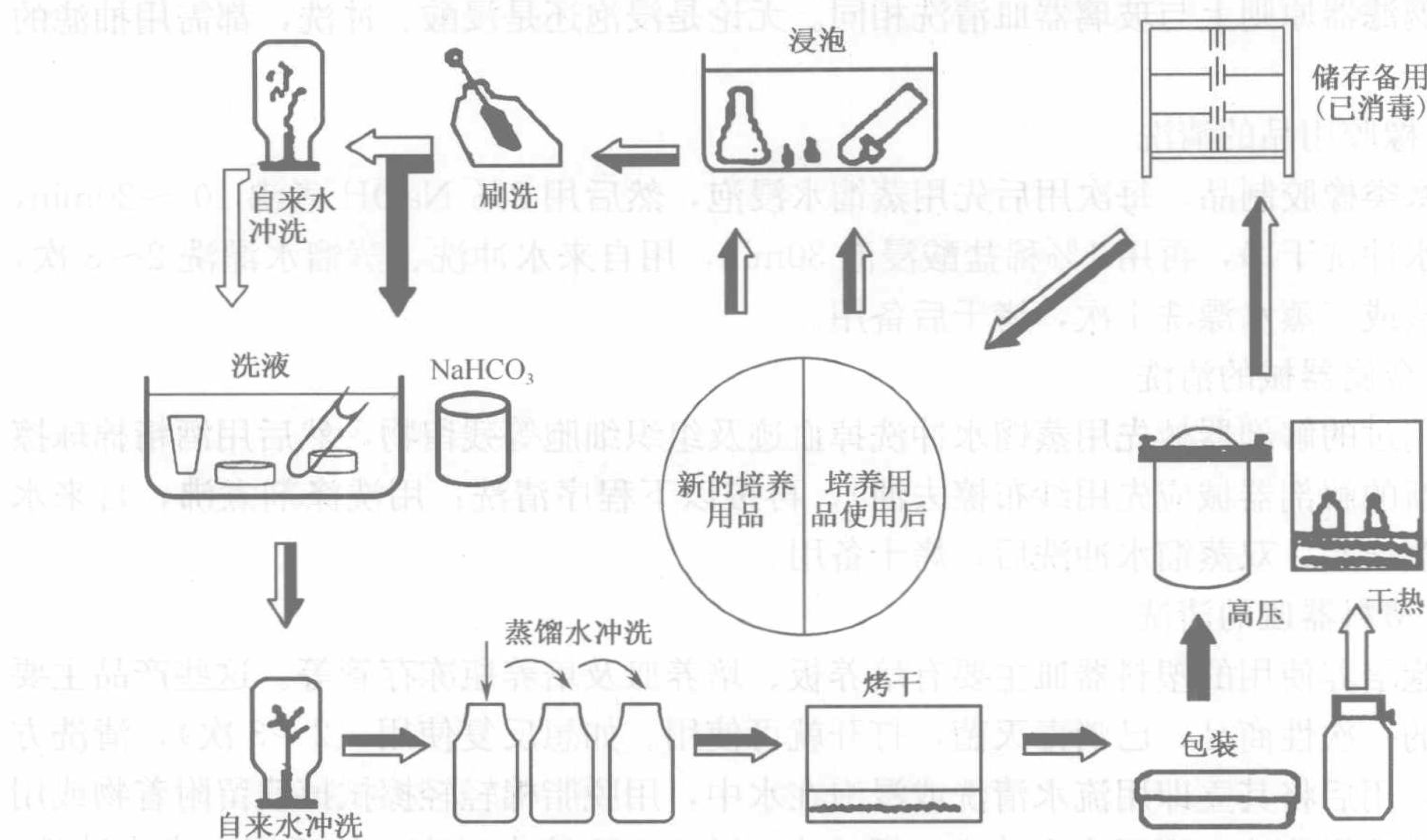


图4-3　培养用品的清洗和消毒程序

（1）浸泡：初次使用和培养用后的玻璃器皿都需先用清水浸泡，以使附着物软化或被溶掉。培养后的玻璃器皿多附有大量蛋白质，干涸后不易刷洗掉，故用完后应立即初步刷洗，浸泡在蒸馏水中，注意要让水完全进入瓶皿中，不要留有气泡。使用新的器皿应先用自来水简单刷洗，然后用稀盐酸（5%）浸泡过夜或煮沸30min，中和其中的碱性物质后再按程序清洗。

（2）刷洗：浸泡后的玻璃器皿要用软毛刷和优质洗涤剂（加热）刷洗，以去除器皿内外表面的杂质。刷洗时注意不要留死角。该过程也可以使用超声波清洗机处理。

（3）浸酸：刷洗不掉的极微量杂质经过清洗液浸泡的强氧化作用可被除掉。清洗液对玻璃器皿无腐蚀作用，去污十分有效，是清洗过程中的关键环节。目前常用的清洗液是由重铬酸钾（potassium dichromate）、浓硫酸和水按一定比例配制而成的。浸泡时器皿要充满洗液，不能留气泡。浸泡时间不应少于6h，一般应浸泡过夜。该清洗液可根据需要，配制成不同强度，常用的有三种。

强液：重铬酸钾63g，浓硫酸1000ml，蒸馏水200ml；

次强液：重铬酸钾120g，浓硫酸200ml，蒸馏水1000ml；

弱液：重铬酸钾100g，浓硫酸100ml，蒸馏水1000ml。

配制时要注意安全，最好戴耐酸手套和防护眼镜操作。要使用防酸、耐热、开口大的容器。配制过程中可先将重铬酸钾溶于水中（有时不能完全溶解，可加热或利用加酸时产

热使其溶解），然后缓慢加入浓硫酸（工业用即可）。新配制的清洁液为棕红色，经多次使用，水分增多或遇有机溶剂时成为绿色，这时表示清洁液已失效，应废弃而重新配制。

本实验室长期使用10%～30%的硝酸溶液，效果也很好。

(4) 冲洗：玻璃器皿浸酸后必须用流水充分冲洗，每个器皿用流水灌满、振荡后倒掉，必须重复10次以上，不留任何残迹。最后用蒸馏水漂洗2～3次，用双蒸水或三蒸水漂洗1次，烤干备用。

玻璃滤器原则上与玻璃器皿清洗相同。无论是浸泡还是浸酸、冲洗，都需用抽滤的方法。

2）橡胶用品的清洗

胶塞类橡胶制品，每次用后先用蒸馏水浸泡，然后用2% NaOH 煮沸10 ～20min，用自来水冲洗干净，再用1%稀盐酸浸泡30min，用自来水冲洗、蒸馏水漂洗2～3次，最后双蒸或三蒸水漂洗1次，烤干后备用。

3）金属器械的清洗

使用过的解剖器械先用蒸馏水冲洗掉血迹及组织细胞等残留物，然后用酒精棉球擦洗后（新的解剖器械应先用纱布擦去油），再按以下程序清洗：用洗涤剂煮沸，自来水冲洗，蒸馏水、双蒸馏水冲洗后，烤干备用。

4）塑料器皿的清洗

细胞培养使用的塑料器皿主要有培养板、培养皿及培养瓶冻存管等。这些产品主要是进口的一次性商品，已消毒灭菌，打开就可使用。如想反复使用（2～3次），清洗方法如下：用后将其立即用流水清洗或浸泡在水中，用脱脂棉轻轻擦拭掉残留附着物或用超声波清洗机清洗，再用流水冲净，浸泡在2%NaOH液中过夜，然后用自来水冲洗，用2%～5%的盐酸浸泡30min后再用自来水冲洗，蒸馏水漂洗2～3次，最后用三蒸水洗2次，晾干备用。使用之前在超净工作台内用紫外线照射30min即可使用，或用γ射线（钴-60）照射处理后使用。

4.1.4　培养用品的灭菌与消毒

【基本原理】

清洗晾干后的器皿要防尘储放，在消毒灭菌前必须进行严密包装后再做消毒处理，以保证灭菌后不受外界的污染。包装材料一般使用牛皮纸、棉布、铝制饭盒以及特制玻璃或金属消毒筒。培养物品消毒灭菌的方法有多种，根据物品不同，采用的方法也不同。总的来说有物理方法和化学方法两大类。物理法包括湿热（高压蒸汽）、干热、过滤和射线等方法杀灭或去除微生物。化学法是使用化学消毒剂、抗菌素等杀灭微生物。

【内容与方法】

1）湿热灭菌消毒

湿热灭菌即高压蒸汽灭菌，是最常用的最有效的一种方法。布类、胶塞、金属器械、玻璃器皿及某些培养用液都可用此法消毒灭菌。各种物品有效消毒灭菌的压力和时间都不同，一般培养用液、橡胶制品要求10lb[①]（114℃），10～20min或8lb（112℃）

---

① 1lb=0.453 592kg。

30min；布类、玻璃制品、金属器械等为15lb（121℃）20min。

2）干热灭菌消毒

干热灭菌主要适用于玻璃器皿的消毒灭菌，即用电热鼓风干燥箱加温到160℃，保持1h，可达到消毒目的。灭菌完成后不要立即打开箱门，以防冷空气骤然进入引起玻璃炸裂。金属器械和橡胶、塑料制品不能使用干热法。

3）滤过除菌

大多数培养用液，如人工合成培养液、血清、酶溶液等，在高温下会变性，失去功能，必须采用滤过法除菌。

玻璃滤器适用于各种培养液的滤过除菌。玻璃滤器根据滤板的孔径分为G_1～G_6几种规格，一般采用G_6型（孔径在1.5μm以下），可达到除菌目的。

微孔滤膜滤器，有一次性和反复使用的两种，选用0.22μm的微孔滤膜滤器就可以达到除菌目的。一次性滤器在无菌环境中打开后就可直接使用，其他各种滤器必须先经高压蒸汽消毒、烤干后方可使用。

4）紫外线灭菌消毒

紫外线常用来消毒空气、操作表面和一些不能用其他方法消毒的物品（如塑料培养皿、培养板等）。一般距紫外灯在2.5m范围内直接照射30min即可。

5）辐射灭菌

大量不适宜用高热或滤过除菌的实验用品或液体，可以用钴-60照射，利用其衰变时放出的γ射线灭菌。如各种塑料培养用品和血清等。一般将实验用品清洗干净、晾干后，用塑料袋封闭包装，摆放于包装纸盒内，用20 000～100 000rad① 的γ射线照射，灭菌效果非常可靠。

6）消毒剂及抗生素

细胞培养室的工作面、家具、墙壁、地面和空气等可用消毒剂进行灭菌处理。如75%酒精常用于皮肤和瓶皿开口部位的消毒；0.1%新洁尔灭，可对器械、皮肤、操作面进行擦拭和浸泡消毒，它是目前最常用的消毒剂；乳酸可用于空气消毒；来苏儿可用于地面消毒；过氧乙酸消毒能力很强，在0.5%的浓度下10min就可将细菌芽孢杀死；0.02%的洗必泰水溶液是目前广泛应用的消毒剂之一，主要用于皮肤及创面的消毒。

抗生素主要适用于培养液消毒灭菌，不同种类的抗生素适于杀灭不同种微生物，多数是为了预防。最常用的抗生素为青霉素、链霉素和庆大霉素。常规培养用液抗生素浓度为：青霉素100单位/ml、链霉素100单位/ml、庆大霉素50μg/ml或100μg/ml 。

4.1.5　无菌操作的基本要领和要求

【基本原理】

在细胞培养中防止污染是决定培养成功或失败的首要条件。由于体外培养细胞缺乏抗感染能力，所以在一切操作中要努力做到最大限度的无菌，防止污染。为达到这一要求，所有工作要进行得有条不紊和安全可靠。

① 1rad=10^{-2}Gy。

【方法与步骤】

1. 培养前的准备

要充分做好培养前的实验用品准备工作，根据实验内容的要求进行物品清点包装，注明标签后灭菌、烤干备用。在工作前移入超净工作台内。

2. 超净工作台的消毒

工作面先用新洁尔灭擦拭一遍后，打开紫外线灯灭菌，用 30 W 紫外线灯管直接照射 20～30min。然后关闭紫外灯，打开风机。培养用液和培养细胞不能放在紫外线下直接照射，在操作时再随手携入。

3. 洗手和着装

原则上与外科手术洗手相同：先用肥皂刷洗手和前臂，再用流水冲洗，然后用 0.2%新洁尔灭或 75%酒精棉球擦洗。穿无菌服，戴无菌帽和口罩。

4. 火焰消毒

在无菌条件下操作时，首先要点燃酒精灯，此后一切操作，如安装吸管橡皮头、打开瓶塞、使用吸管等都要经过火焰烧灼，或在近火焰处进行。注意金属器械不能在火焰上烧灼时间过长，以防熄火。烧过的用具要待冷却后才能挟取组织，以免造成组织损伤。

5. 无菌培养操作

进行细胞培养操作时，动作要准确敏捷，但又不能太快，以防空气流动增加污染机会。不能用手触及器皿的无菌部分，如已接触，要更换或用火焰烧灼触及部。为拿取方便，工作台面上的布局要合理，原则上为右手使用方便的用品放在右侧，左手用品在左侧。培养液等既不要过早开瓶也不要长时间直立暴露开口，以免增加污染机会。吸取不同用液时，均应使用不同的吸管，以防扩大污染或增加混淆不同细胞的机会。

4.1.6　细胞培养用液

细胞培养用液是维护细胞在体外生存、生长、繁殖，以及进行细胞培养操作过程中所需的基本溶液。主要包括培养液、平衡盐溶液、消化液、pH 调整液、抗生素溶液和谷氨酰胺溶液等。

【基本原理】

培养用液都是直接与细胞接触的液体，必须做到无毒、无菌、等渗、稳定适宜的 pH，以及富含生长所需的各种营养。因此，所有培养用液都要使用新鲜的三蒸水配制，培养用液中的各种成分要严格选择品质优良的产品，所用容器要严格清洗、灭菌后使用，配制好的培养用液还要在低温下储存，以免失效。

【实验用品】

CO_2培养箱、超净工作台、电冰箱、离心机、倒置相差显微镜、普通显微镜、水纯化装置、抽滤装置、高压灭菌锅、电热干燥箱、电子天平、液氮罐、洗刷装置、各类培

养用品等。

【内容与方法】

1. 平衡盐溶液

平衡盐溶液（balanced salt solution，BSS）主要是由无机盐和葡萄糖组成，具有维持渗透压，调节酸碱平衡，为细胞生存提供所需能量和无机离子成分作用，还可以用作洗涤组织细胞，配制各种培养用液的基础溶液。几种常用的BSS的配方见表4-1。一些BSS内含有少量酚红作为pH变化的指示剂，溶液变酸时呈黄色，变碱时呈紫红色，中性时呈桃红色。

表4-1　几种常用的平衡盐溶液（BSS）配方（g/L）

化合物	Ringer	PBS	Tyrode	Farle	Hank's	D-Hank's	Dulbecco
NaCl	9.00	8.00	8.00	6.80	8.00	8.00	8.00
KCl	0.42	0.20	0.20	0.40	0.40	0.40	0.20
$CaCl_2$	0.25	—	0.20	0.20	0.14	—	0.10
$MgCl_2 6H_2O$	—	—	0.10	—	—	—	0.10
$MgSO_4 7H_2O$	—	—	—	0.20	0.20	—	—
$Na_2HPO_4 H_2O$	—	1.56	—	—	0.06	0.06	—
$NaH_2PO_4 2H_2O$	—	—	0.05	0.14	—	—	1.42
KH_2PO_4	—	0.20	—	—	0.06	0.06	0.20
$NaHCO_3$	—	—	1.00	2.20	0.35	0.35	—
葡萄糖	—	—	1.00	1.00	1.00	—	—
酚红	—	—	—	0.02	0.02	0.02	0.02

目前细胞培养最常用的BSS是Hank's溶液、PBS溶液和D-Hank's溶液等。以下是几种常用的BSS配制方法。

1）Hank's溶液

为了便于保存和减少有关成分化学反应，常配成浓缩液。配制方法如下：

（1）浓缩母液配制（10×）方法：

A液：取450ml三蒸水依次溶解下列试剂

NaCl	80g
KCl	4g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2g
$CaCl_2$	1.4g（$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.85g）

待完全溶解后，补足三蒸水至500ml。

B液：取450ml三蒸水依次溶解下列试剂

Na_2HPO_4	0.6g（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 1.52g）
KH_2PO_4	0.6g
葡萄糖	10g

0.4%酚红　50ml

(2) 工作液配制法。

取上述A、B液等量，用三蒸水稀释10倍，即成工作液，高压灭菌，4℃保存。例如配制1000ml Hank's溶液，则取三蒸水900ml加入A液50ml、B液50ml混匀，用10磅（114℃）高压灭菌15min。临用时，用7.4%$NaHCO_3$调至所需的pH。

2) PBS液

可配成含0.85%NaCl，pH 7.2的PBS（简称pH7.2 PBS）

(1) PBS储存液（10×）配制方法：

NaCl	8.5g
KCl	0.2g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2.85g（或$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 1.13g）
KH_2PO_4	0.27g

溶于100ml三蒸水中。

(2) PBS工作液配法。

取储存液50ml，加三蒸水450ml即成，高压灭菌，4℃保存。

3) D-Hank's溶液

为无钙、镁的Hank's溶液，可用于配制消化液和洗涤细胞用液。配制方法：

NaCl	8g
KCl	0.40g
$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$	0.06g
KH_2PO_4	0.06g
$NaHCO_3$	0.35g
酚红	0.02g

以上成分依次溶于500ml三蒸水内，完全溶解后，补足三蒸水至1000ml。

4) CMF（10×）（不含Ca^{2+}和Mg^{2+}的平衡盐溶液）配制方法

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	0.92g
KCl	1.50g
KH_2PO_4	0.1g
NaCl	40g
葡萄糖	10.00g
酚红	0.1g

将上述药品依次溶入三蒸水，至完全溶解后，用三蒸馏水定容至500ml，加入1ml氯仿，保存于室温或4℃冰箱冷藏，使用时稀释10倍即可。

2. 培养液

现在各实验室普遍使用商品化合成培养基（medium），它是根据不同的细胞在体内生存的营养代谢需求特点，设计出的类似体内环境而适合细胞在体外生存的各种类型的培养基。当粉剂合成培养基配成液体后称为培养液，其主要成分是平衡盐溶液加氨基酸、维生素、糖类。对于动物细胞来说，合成培养基只能维持细胞的生存，要想使细胞

更好地生长和繁殖，还需补充天然培养基和抗生素等成分，最常用的天然培养基是小牛血清或胎牛血清，通常在合成培养基中添加10%～20%的小牛血清或胎牛血清。在培养过程中，有些细胞可能会分泌活性物质到培养液中，这种培养过某种细胞以后，含有细胞分泌物的培养液称为条件培养液（conditioned medium）。

合成培养基常用的有十多种，可以参阅细胞库，如ATCC（America Type Culture Collection，http://www.atcc.org/）和 ECACC（Centre for Applied Microbiology & Research，http://www.camr.org.uk/）库存细胞资料选择合适的培养基。目前使用最广泛的是RPMI 1640、DMEM和Eagle MEM，混合培养基以DMEM/F12较多。

Eagle MEM是最低限度基本培养基，仅含12种必须氨基酸、谷氨酰胺和8种维生素，成分简单，广泛适用于各种细胞系的培养，宜于添加某些成分配制特殊研究细胞的培养液；DMEM培养基中大部分成分的含量加倍，适合于高密度、大量繁殖的细胞培养；RPMI 1640最初为培养淋巴细胞而设计，现在发现它适应于多种类型的细胞，包括正常细胞和肿瘤细胞；Ham F12添加了Cu^{2+}、Zn^{2+}、Fe^{2+}等微量元素，适用于细胞的低血清、克隆化培养；DMEM/F12（1∶1）混合培养基，常用于细胞的原代培养、难培养的细胞系，也是组成无血清培养基的基础培养液。

液体培养基（liquid medium）购回后直接或稀释后即可使用。粉制培养基（powdered medium）是用喷雾法将各种培养基成分混合后制成，具有性质稳定，储存、运输、使用方便的特点。

合成培养基的配制：各种合成培养基的配制方法大致相同，以下以配制1000ml为例。

（1）取一袋干粉培养基（配1000ml量）或按说明书准确称取干粉培养基（如RPMI 1640为10.4g），在大烧杯中溶于500ml三蒸水中，再移入1000ml容量瓶，加三蒸水至1000ml。

（2）用无菌滤器（G_6型玻璃滤器或0.22μm微孔滤膜滤器）过滤除菌。

（3）分装在无菌盐水瓶中，密封，－20℃保存。

（4）用前添加血清、抗生素，用7.4%$NaHCO_3$调整pH，4℃保存（短期内使用）。

3. 体外培养的其他常用液体

在细胞培养中除了以上重要培养用液外，还需要一些必需的基本用液。主要包括消化液、消化酶抑制剂、pH调整液、抗生素、谷氨酰胺（L-glutamine）、促贴壁成分和酚红溶液等。

1）消化液

消化液主要用来从组织中分离细胞或传代时将贴壁生长的单层细胞脱离附着底物表面和分散成单个细胞。它们主要是一些能对组织有消化作用的酶，如常用的胰蛋白酶（trypsin solution）、胶原酶（collagenase）和对细胞有一定解离作用的化学螯合剂EDTA（ethylene diamine tetraacetic acid）。

（1）0.25%胰蛋白酶：胰蛋白酶粉0.25g，加D-Hank's溶液100ml，放4℃冰箱4h，不时搅拌，振荡，待完全溶解后，过滤除菌，调整pH至7.4～7.8，分装密封后－20℃冰箱保存。

注：①由于Ca^{2+}和Mg^{2+}能够降低酶的消化作用，因此需要用无Ca^{2+}、Mg^{2+}的平衡盐溶液配制；②胰蛋白酶溶液在pH 8.0，温度37℃时作用力最强，可以根据细胞特点调整pH。

（2）0.02%EDTA液：EDTA 0.2g，加D-Hank's溶液1000ml，可蒸汽高压灭菌，用前调整pH至7.4，4℃冰箱保存。

EDTA和胰蛋白酶混合使用对细胞损伤小，消化作用好。可以分别配成0.5%胰蛋白酶液和0.04%的EDTA液，用前1：1混合使用。

（3）胶原酶：胶原酶有Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ型及肝细胞专用胶原酶五种，其活性为125～200U/mg湿重，1U代表能使胶原释放1μmol亮氨酸活性程度。分离胰岛细胞采用Ⅳ型胶原酶；Ⅱ型胶原酶主要用于消化肝、骨、甲状腺、心脏、唾液腺等组织的细胞制备；Ⅲ型胶原酶对哺乳动物的组织有广谱的消化作用。可根据不同组织选择胶原酶。

通常配成10×储存液，－20℃冰箱保存，使用前10倍稀释。一般使用浓度为1～5mg/ml 。

2）pH调整液

用来调整各种培养用液的pH，常用的pH调整液为7.4%$NaHCO_3$、1mol/L HCl和HEPES。通常单独配制，在培养用液使用前加入。

（1）7.4%$NaHCO_3$：7.4g $NaHCO_3$加三蒸水至100ml，完全溶解后，过滤除菌，分装密封后4℃冰箱保存。

（2）1mol/L HCl：37%HCl 8.4ml，加三蒸水至100ml，过滤除菌，密封后4℃冰箱保存。

（3）HEPES液

HEPES是一种氢离子缓冲剂，能较长时间维持培养液恒定的pH范围，尤其对开放培养的细胞作用更明显。它使用的终浓度为10～50mmol/L，可根据缓冲能力要求而定。HEPES的分子式为$C_8H_{18}O_4N_2S$，相对分子质量为238。

①配液时可直接加入到培养液中（1000ml培养液中加入2.38g HEPES，终浓度为10mmol/L），滤过除菌后使用。

②也可以单独配制成100×储存液（1mol/L）过滤除菌后使用。

1mol/L HEPES溶液：238.3g HEPES加三蒸水至1000ml，过滤除菌，分装（2ml/瓶）密封后4℃或－20℃冰箱保存。使用时每99ml培养液加入1ml储存液，最终浓度为10mmol/L。

3）抗生素溶液

在培养用液中加入适量抗生素，可预防操作不慎产生的污染。常用的有青霉素、链霉素、庆大霉素、卡那霉素、两性霉素B等，各种抗生素用量见表4-2。

配液时可直接加入到培养液中，滤过除菌后使用。也可以用无菌三蒸水单独配制成100×储存液，分装小瓶中，－20℃保存，配液时加入。

4）谷氨酰胺溶液

谷氨酰胺（L-Glutamine）可作为能源和碳源被培养细胞所利用，但由于谷氨酰胺在溶液中很不稳定（4℃下放置7d可分解50%），培养液放置2周就需要重新补加等量

的谷氨酰胺，故需要单独配制谷氨酰胺溶液，以便临时加入培养液中。谷氨酰胺使用浓度为1～4mmol/L，常配成100×浓度使用。

表4-2　常用抗生素用量

抗生素	浓度	
	范围	实用
青霉素G	10～1000U	100U/ml
链霉素	10～1000μg	100μg/ml
庆大霉素	10～200μg	50μg/ml
卡那霉素	10～1000μg	100μg/ml
多黏菌素	10～1000μg	50μg/ml
四环素	5～50μg	10μg/ml
红霉素	10～100μg	50μg/ml
两性霉素B	1～50μg	3μg/ml
制霉菌素	1～500U	50U/ml

L-谷氨酰胺溶液（200mmol/L）配制方法：

取L-谷氨酰胺3g（相对分子质量146.15），溶于100ml三蒸水中，过滤除菌，分装，－20℃冰箱保存。使用时每100ml培养液中加入1ml谷氨酰胺。

5）0.4%酚红溶液

称取酚红0.4g，置洁净玻璃研钵（按培养瓶方式清洗）中研细，逐渐加入0.1mol/L NaOH，边滴边研至酚红完全溶解，共加至11.28ml为止，将研好的酚红液移入烧瓶中，加三蒸水88.72ml。10lb（114℃）高压灭菌15min，4℃保存。

6）促贴壁基质液

在血清中含有促细胞贴壁附着成分，多数种类的细胞一般不需要补充这种物质，但一些细胞特别是分化程度较高的正常细胞如神经细胞、胚胎干细胞滋养层成纤维细胞等，对附着底物有特殊要求，通常需要在培养器皿生长面上涂上一层促细胞贴壁的基质成分。

目前最常用的基质成分及其使用浓度为：多聚赖氨酸（polylysine）0.1mg/ml、纤连蛋白25～50μmol/ml、层粘连蛋白1～5μmol/ml。

胶原也是一种促细胞生长的良好的基质，鼠尾胶原较为常用，可以促进细胞贴壁，特别是上皮类细胞，经济实用。其制作方法如下：①配制1%的乙酸溶液，高压灭菌后备用；②取体重250g重的大白鼠1只，从尾部切断鼠尾，去皮后浸入95%的乙醇中固定15min；③抽取尾部肌腱中胶原，剪碎，浸入75%的乙醇中消毒30min；④用无菌双蒸水冲洗胶原数次，以洗去酒精，然后浸入1%的乙酸溶液中（每100ml中放1～2条鼠尾部的胶原），置4℃冰箱中24h，期间不断拿出振摇；⑤24h后移入无菌离心管中以3000r/min转速离心30min（最好在4℃条件）；⑥吸取上清液分装入小瓶，于－20℃冰箱中保存备用。

注：①胶原的制备过程要求无菌操作，使用时融化，用吸管滴在培养器皿表面，用自制L形玻璃棒均匀涂布，然后吸出多余尾胶，放入无菌铝饭盒内，于37℃普通培养箱干燥48h后加入未加血清的培养液浸泡备用。②根据我们的经验，使用上述配置的鼠

尾胶原对玻璃器皿涂胶，干燥后可以长期保存，用前放铝饭盒内高压灭菌，烤干后备用。

（辛华）

4.2　细胞培养的方法

细胞培养可分为原代培养和传代（继代）培养。直接从生物体内获取细胞进行首次培养称为原代培养（primary culture），当培养的细胞增殖达一定密度后，则需要做再培养，即将培养的细胞分散后，从一个容器以 1∶2 或其他比率转移到另一个容器中扩大培养，为传代培养（passage culture）。传代培养的累积次数就是细胞的代数。

4.2.1　原代细胞培养

直接从生物体内获取组织细胞进行首次培养称原代细胞培养。原代培养是获取细胞，建立各种细胞系的第一步，是从事细胞培养工作最基本的技术。原代培养方法很多，最基本的有两种，即组织块培养法（explant culture）和单层细胞培养法（monolayer culture）。本实验将分别介绍这两种方法。

【实验用品】

（1）器材：超净工作台、CO_2 培养箱、普通显微镜、倒置相差显微镜、水浴箱、离心机、解剖剪、解剖镊、眼科剪、眼科镊、培养皿、培养瓶、24 孔培养板、离心管、微量加样器、吸管、移液管、血球计数板、橡皮吸头、胶塞（00 号，盐水瓶、翻口塞）酒精灯、试管架、75%乙醇、棉球、无菌服、口罩、帽子等。

（2）试剂：RPMI 1640 培养液（含 10%的小牛血清和青霉素 100U/ml、链霉素 100μg/ml，pH7.2）、0.25%胰蛋白酶、Hank's 溶液、7.4%$NaHCO_3$。

（3）材料：新生乳鼠或胎鼠、中国仓鼠卵巢细胞（CHO）或人宫颈癌细胞（HeLa）。

4.2.1.1　单层细胞培养法

【实验原理】

组织细胞之间中都含有一定量的细胞间质（细胞外基质等），妨碍细胞生长。用酶消化后，能除去间质，使组织松散，容易分离成单个细胞或较小的细胞团，接种后细胞易于生长。

【方法与步骤】

1. 取材

取新生乳鼠一只，采用颈椎脱臼法处死，或放置−20℃冰箱片刻，使之不动后，携入超净工作台内，浸入 75%乙醇中浸泡 2～3s，置于消毒培养皿中，无菌操作取材。用弯头眼科镊夹起腹部皮肤，剪开腹腔和胸腔，并剪去部分胸壁以充分暴露胸腔，用眼科镊轻轻夹起粉红色肺组织并剪下（或在腹腔背壁脊椎两侧取下肾脏）放入另一培养皿中。用 Hank's 溶液清洗，去掉血污。

2. 消化与分散组织块

把组织块移入无菌青霉素瓶中，用眼科剪将组织块剪成 $1mm^3$ 大小的小块，再用 Hank's 溶液洗涤 2～3 次，至液体澄清方可。弃去 Hank's 溶液，加入 5～10 倍体积的 0.25%胰蛋白酶（pH7.2～7.4），盖好橡皮塞，置 37℃水浴中消化 20～30min，每隔 5min 摇动一次，使组织块散开。当组织块变得疏松，颜色略变白时，从水浴中取出，在超净工作台中用吸管轻轻吸去消化液，加入 2～3ml 培养液（血清中含有胰蛋白酶抑制剂），以终止消化。然后用吸管反复吹打，使大部分组织块分散成细胞团或单个细胞状态，静置片刻，让未被消化完的组织自然下沉，然后将上层细胞悬液移入无菌离心管中备用。

3. 离心和计数

离心管平衡后以 800～1000r/min 离心 5～10min，弃去上清液，加入适量培养液，用吸管轻轻吹打混匀后取样计数（细胞计数方法见本章 4.3.3）。根据计数结果用培养液调整细胞密度为 5×10^5/ml 细胞悬液。

4. 接种培养

每 $15cm^2$ 培养瓶接种 1ml 细胞悬液，再添加 3ml 培养液，轻轻混匀后盖紧瓶塞，标上细胞名称、组号和接种日期等，置 37℃恒温培养箱中密闭培养。也可以接种在 24 孔培养板或螺旋口培养瓶内，置 5%CO_2 培养箱中开放培养。单层细胞培养接种密度一般在 $1\sim10\times10^5$ 细胞/ml 培养液范围，可根据不同类型细胞和实验要求来确定接种密度（图 4-4）。

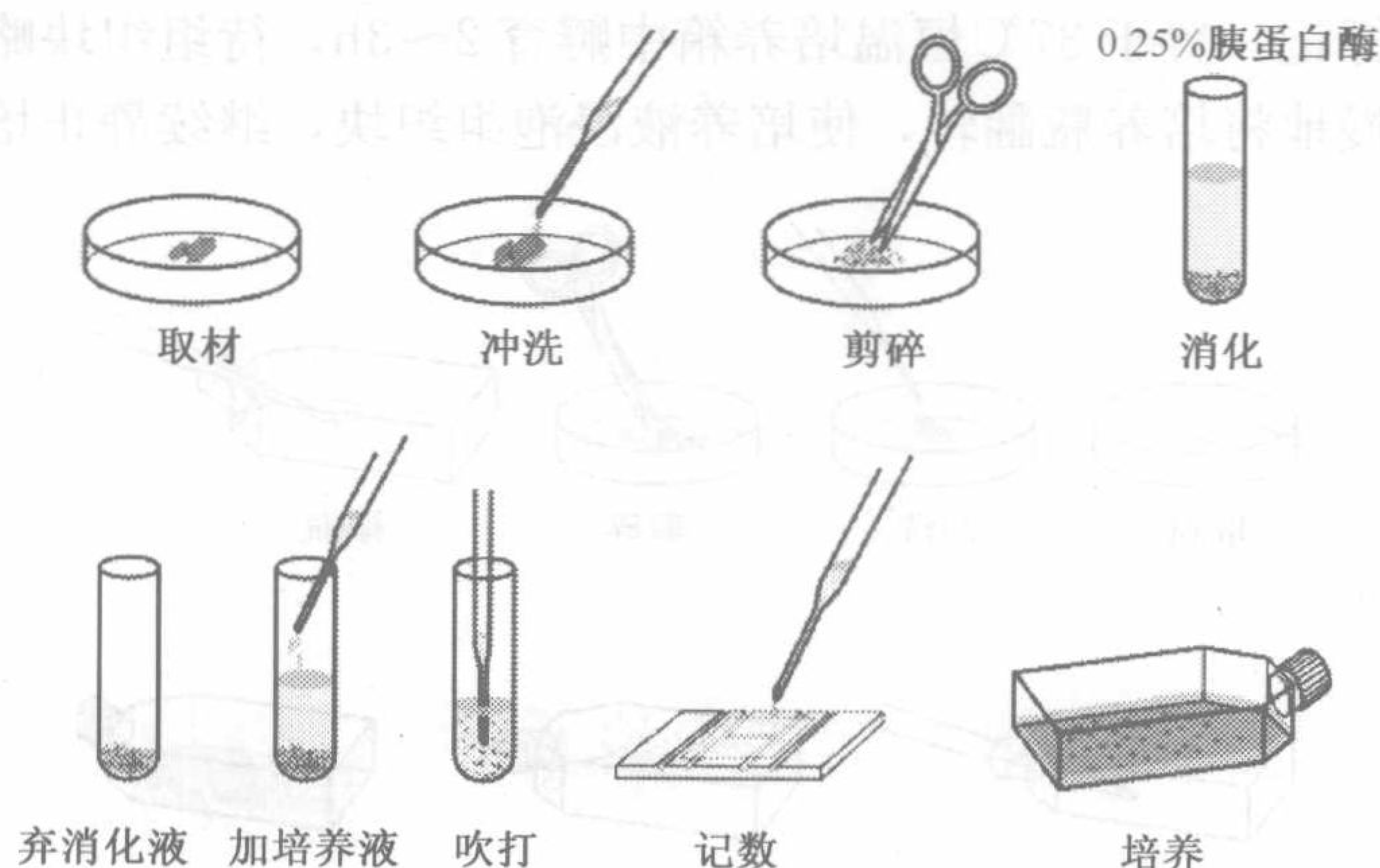


图 4-4　单层培养法

5. 观察

接种后每天要对培养的细胞做常规观察，注意有无污染、pH 变化（培养液颜色变化）、细胞贴壁和生长情况等。如有污染，培养液呈现迅速变黄、pH 降低、液体浑浊或出现菌落。

正常情况下，接种 24h 后，可见到许多细胞贴壁（由圆形悬浮状态延展成短梭状）。培养 3～4 天时，细胞生长增殖旺盛，数量增加，并可见细胞形成独立小片（细胞岛）。细胞结构清晰，颗粒少，界限清楚。由于细胞生长旺盛，代谢产物不断堆积，CO_2 增多，培养液逐渐变酸呈黄色，但液体仍澄清，此时可换液一次。约 7～10 天细胞已基本铺满瓶形成致密单层，这时可进行传代培养。

4.2.1.2　组织块培养法

【实验原理】

组织块培养是常用的、简便易行和成功率较高的原代培养方法。把组织切割成 0.5～1mm^3 的小块后，由于组织块体积很小，在不加任何黏附剂的情况下，它们也能直接贴附于瓶壁上，然后细胞自组织块边缘向外长出生长晕，最后细胞连接成片，形成单层培养细胞。此方法程序比较简单，所以是当前各培养室常用的方法。

【方法与步骤】

1. 取材

从动物体内取材方法与单层细胞培养取材相同。将取出的组织（肝、肾或肺）移入无菌培养皿中，用 Hank's 溶液冲洗，去除血污。然后移入无菌青霉素小瓶或培养皿中，用眼科剪将组织反复剪成 0.5～1mm^3 的小块，再用吸管加 2～3 滴细胞培养液，用吸管轻轻吹打，使组织块悬浮在培养液中。

2. 接种

用吸管分次吸取组织块悬液（吸取时注意让组织块吸在吸管端部，以免吸得过高，黏附管壁而丢失），将其均匀分布在培养瓶底壁上，翻转培养瓶，加入 2～3ml 培养液，塞紧瓶塞，做好标记，置于 37℃恒温培养箱中孵育 2～3h，待组织块略干燥能牢固黏附于瓶壁上，再缓慢地将培养瓶翻转，使培养液浸泡组织块，继续静止培养（图 4-5）。



图 4-5　原代组织块培养步骤

3. 观察

组织块静止培养 2～3 天后，每天小心取出培养瓶置于倒置相差显微镜下进行观察（注意尽量少振摇培养液，以防组织块脱落）。注意有无污染，已贴壁的组织块边缘有无

细胞"长"出。一般最先"长"出的是形态不规则的游走细胞，接着"长"出成纤维细胞或上皮细胞。"长"，实际是从组织块移动出来的细胞，尚很少有细胞分裂，后逐渐出现细胞分裂，细胞数量增多，在组织块周围形成较大生长晕。随之细胞生长较快，可根据培养液颜色变化，补加和更换培养液，同时注意吸除漂浮的组织块。细胞生长良好时，7～15天可长成致密单层，这时可进行传代培养。

4.2.2　细胞传代培养

【实验原理】

当细胞增殖达一定密度后，细胞的生长和分裂速度逐渐减慢、停止（出现密度抑制现象），如不及时进行分离再培养（传代），细胞将逐渐衰老死亡。因此，将培养的细胞以1∶2或其他比率扩大培养，称为传代培养。

大多数细胞在体外培养时能贴附在支持物表面生长，称为贴附型生长细胞。少数种类的细胞在培养时不贴附于支持物上，而呈悬浮状态生长（如某些癌细胞和血液白细胞），称悬浮型生长细胞。在体外这两种不同生长类型的细胞传代方式不同，贴附型生长细胞用酶消化法传代，而悬浮型生长细胞用直接传代法或离心法传代。

【实验用品】

（1）器材：细胞培养仪器与原代细胞培养相同。其他用品有培养瓶、离心管、吸管、移液管、各类橡皮吸头和胶塞、酒精灯、试管架、酒精棉球。

（2）试剂：RPMI 1640培养液（含小牛血清和青霉素、链霉素）、0.25%胰蛋白酶、Hank's溶液、7.4%$NaHCO_3$。

（3）材料：HeLa细胞或原代培养细胞、红白血病K562细胞。

4.2.2.1　贴附生长细胞的传代

【方法与步骤】

1. 洗细胞

取已长成或接近长成致密单层的HeLa细胞（或原代培养细胞），倒去培养液，加入2～3ml Hank's溶液，轻轻摇晃漂洗细胞后倾去，以去除残留的血清和衰老脱落的细胞和碎片。

2. 消化

加入适量（覆盖细胞面即可）0.25%胰蛋白酶，室温下（或37℃）消化2～3min后，倒置相差显微镜下观察细胞单层，待细胞成片地收缩，细胞之间出现许多空隙时即可将培养瓶立起来，用吸管吸出消化液（可加Hank's溶液轻轻洗一遍后倾出或直接进行下一步操作）。如在酶消化过程中，见细胞大片脱落，表明消化过头，则不能倒去消化液（以免丢失细胞），需加入等量的培养液吹打、收集细胞，800r/min离心5min后弃上清液后再进入下一步。

3. 接种

在培养瓶中加入3ml培养液，以终止消化。用吸管反复吹打瓶壁上的细胞层，直

至全部细胞被冲下，轻轻吹打混匀，制成单细胞悬液，按 1：2 或 1：3 分配，接种到 2～3 个培养瓶内，再向各瓶补加培养液到 4ml。也可以取细胞悬液计数，分别按需要的细胞密度接种到其他的培养瓶中，再补足培养液进行培养。

原代培养的细胞首次传代时，细胞接种数量要多一些，以使细胞尽快适应新环境，利于细胞生存和增殖。随消化分离下来的组织块也可一并传入新的培养瓶（图 4-6）。

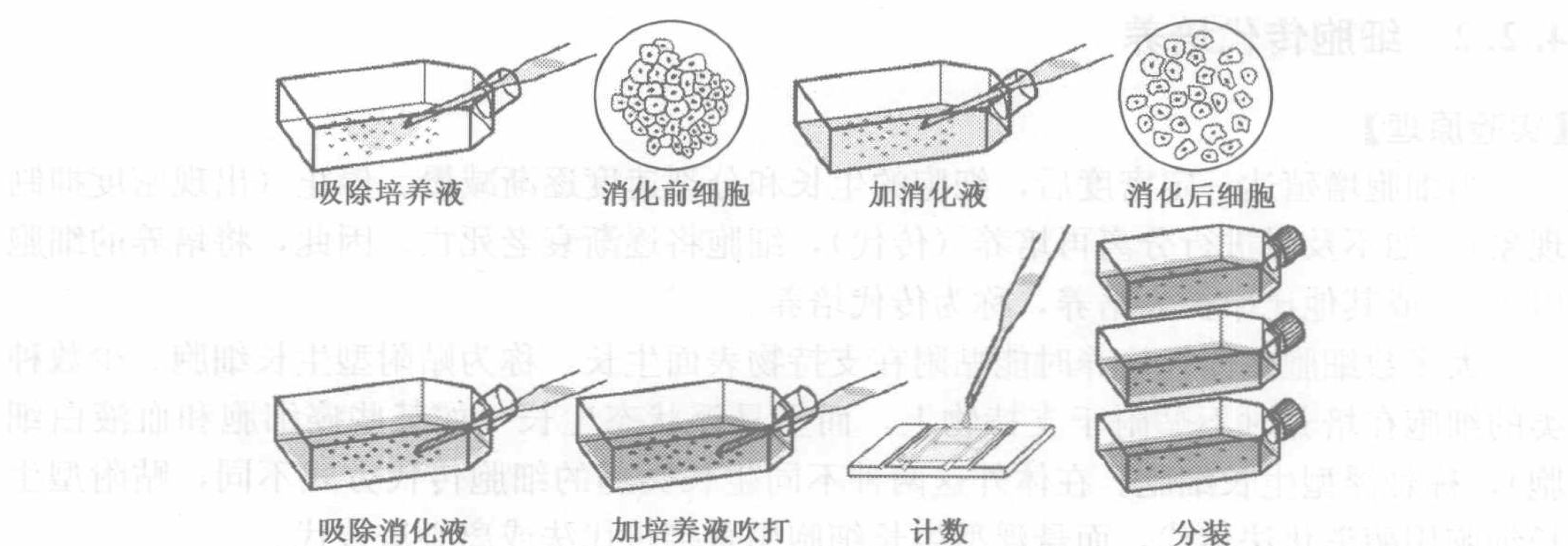


图 4-6　传代细胞培养步骤

4. 观察

细胞传代后，每天应对培养细胞进行观察，注意有无污染、培养液的颜色变化、细胞贴壁、生长情况等。若细胞贴壁存活则称为传了一代。

4.2.2.2　悬浮生长细胞的传代

由于悬浮生长细胞不贴壁（如红白血病 K562 细胞），故传代时不必采用酶消化法，而可直接传代或离心收集细胞后传代。

【方法与步骤】

1. 直接传代（图 4-7）

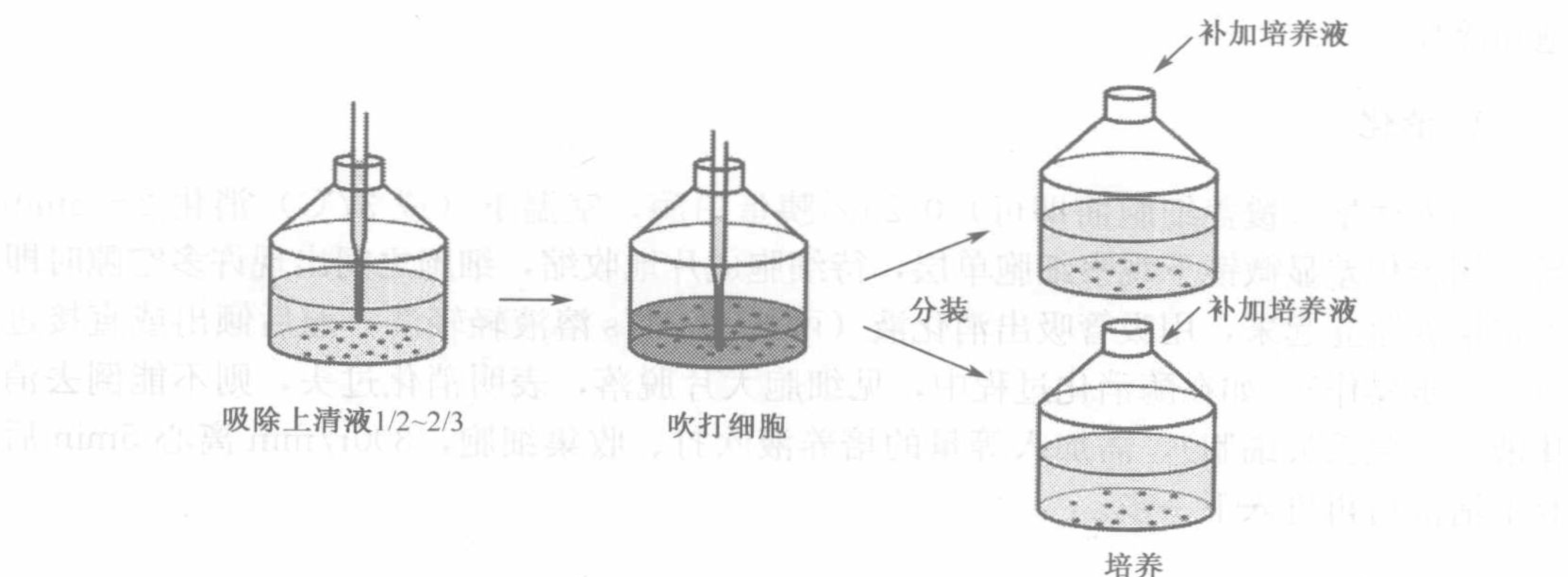


图 4-7　悬浮细胞的直接传代

直接传代即让悬浮细胞漫漫沉淀在瓶底后，将上清液吸掉1/2～2/3，然后用吸管吹打形成细胞悬液后，再传代。

2. 离心传代（图4-8）

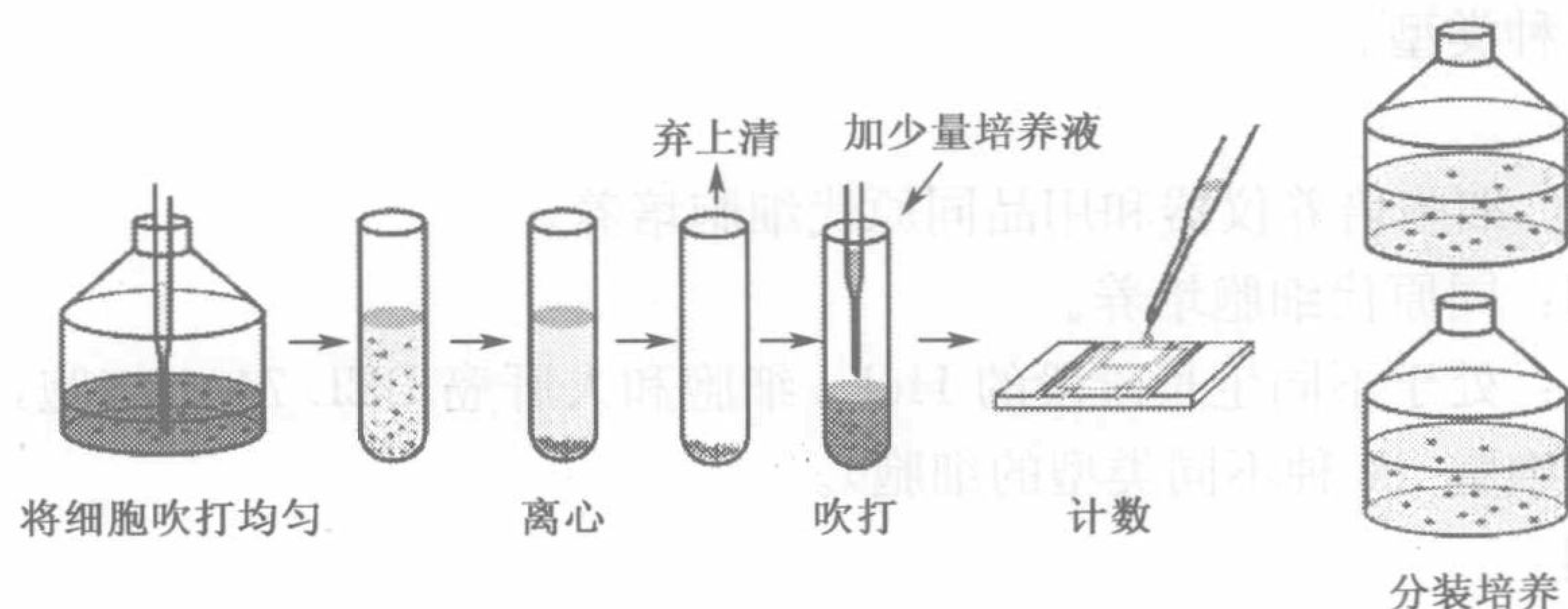


图4-8　悬浮细胞的离心传代

（1）在超净工作台内用小吸管（弯头）将培养瓶中的细胞吹打均匀，尤其是将那些半贴壁的细胞吹打起来。

（2）吸入离心管中，旋紧胶盖，与另一离心管平衡后置离心机中800～1000r/min离心5min。

（3）回到超净工作台操作，弃上清液，加入适量新培养液，用吸管吹打均匀，制成细胞悬液。

（4）按1∶2或1∶3分配传代培养，也可以计数后根据所需要的细胞密度传至培养瓶或培养皿中，放入培养箱继续培养。

注：若只为了培养细胞保种，可以吸取少量细胞悬液至另一瓶中，加入适量新培养液即可，不必经离心步骤。

（辛华）

4.3　体外培养细胞的观察方法

在细胞原代培养或传代后的生存期间，应该每天对培养细胞进行常规检查，观察细胞是否有污染、细胞的生长状态、培养液pH变化，是否需要换液等。在此基础上，根据需要，再进一步做一般和特殊细胞生物学特性的检测。掌握体外培养细胞的一般观察方法，是学习细胞培养技术的重要内容。本节将介绍单层培养细胞接种后一般生长过程、培养细胞的形态分类、培养细胞固定染色观察的一般标本制备方法以及细胞的计数方法和培养细胞存活率检测。

4.3.1　培养细胞的生长特征与形态分型

【实验原理】

一般单层培养的细胞，从接种培养开始，要经过生长、繁殖、衰老及死亡的连续过程。可将其分为5个时期，即游离期、吸附期、繁殖期、维持期、衰退期，但各期间无

绝对的界限。一般在对数生长期进行传代，以保持传代细胞良好的增殖活性。

人和动物体内的细胞有着复杂的形态结构和功能，当它们离体后在体外培养时，由于脱离了体内特定的环境，形态上往往表现单一化，而且供体年龄越幼稚，这种现象越明显，并能反映其胚层起源。体外培养细胞大致分为上皮细胞型、成纤维细胞型、游走型和多形型 4 种类型。

【实验用品】

（1）器材：细胞培养仪器和用品同原代细胞培养。

（2）试剂：同原代细胞培养。

（3）材料：处于不同生长阶段的 HeLa 细胞和人肝癌 BEL-7402 细胞，来自不同组织的原代培养细胞（4 种不同类型的细胞）。

【内容和方法】

1. 单层培养细胞的生长过程

1）各期细胞主要生长特点

从细胞接种到下一次传代再培养的一段时间为一代。该过程细胞要经过生长、繁殖、衰老及死亡的连续过程。

（1）游离期：细胞经消化分散后，由于原生质收缩和表面张力以及细胞膜的弹性，细胞变成圆形，折光性强，呈悬浮状态，此期可延续数小时。

（2）吸附期：单细胞悬液静置培养一段时间后（不同细胞所需的时间不同），细胞开始贴壁。各种细胞的贴附特性不同，原代培养细胞贴附较慢，可长达 5～24h 或更长；连续细胞系和肿瘤细胞则快些，10～30min 即可贴附。细胞贴壁后，圆形细胞变成延展状态，细胞立体感强，细胞质颗粒少而透明。

（3）繁殖期（生长期）：此时细胞快速生长和分裂（可观察到有许多折光性强的圆形细胞），细胞数目增多，由几个细胞形成细胞岛（由少数细胞紧密聚集而呈现的孤立细胞群）到形成良好的细胞单层，细胞透明，颗粒少，细胞之间界线清楚，可见到细胞核。根据细胞所占瓶壁有效面积的百分率，又可将其生长状态分为四级：常以“＋”多少表示：

＋：细胞占瓶壁有效面积的 25％以内。

＋＋：细胞占瓶壁有效面积的 25％～75％。

＋＋＋：细胞占瓶壁有效面积的 75％～95％，并具有新生细胞。细胞排列致密，但仍然有空隙。

＋＋＋＋：细胞占瓶壁 95％以上，细胞已长满或接近长满单层，细胞致密，透明度好。

从＋＋～＋＋＋＋为细胞对数生长期。

（4）维持期：细胞形成良好单层后，生长和分裂速度开始减慢，折光性强的圆形分裂细胞减少，逐渐停止生长（即出现密度抑制现象）。此时细胞界限逐渐模糊，细胞内颗粒增多，透明度降低，立体感较差。由于细胞代谢物的积累，CO_2 增多，培养液逐渐变黄。

（5）衰退期：当细胞形成致密单层以后，由于营养的缺乏，代谢物积累，细胞内颗

粒进一步增多，透明度更低，立体感很差。最后细胞皱缩，细胞质出现空泡，逐渐衰老而死亡，从瓶壁上脱落下来（图 4-9）。

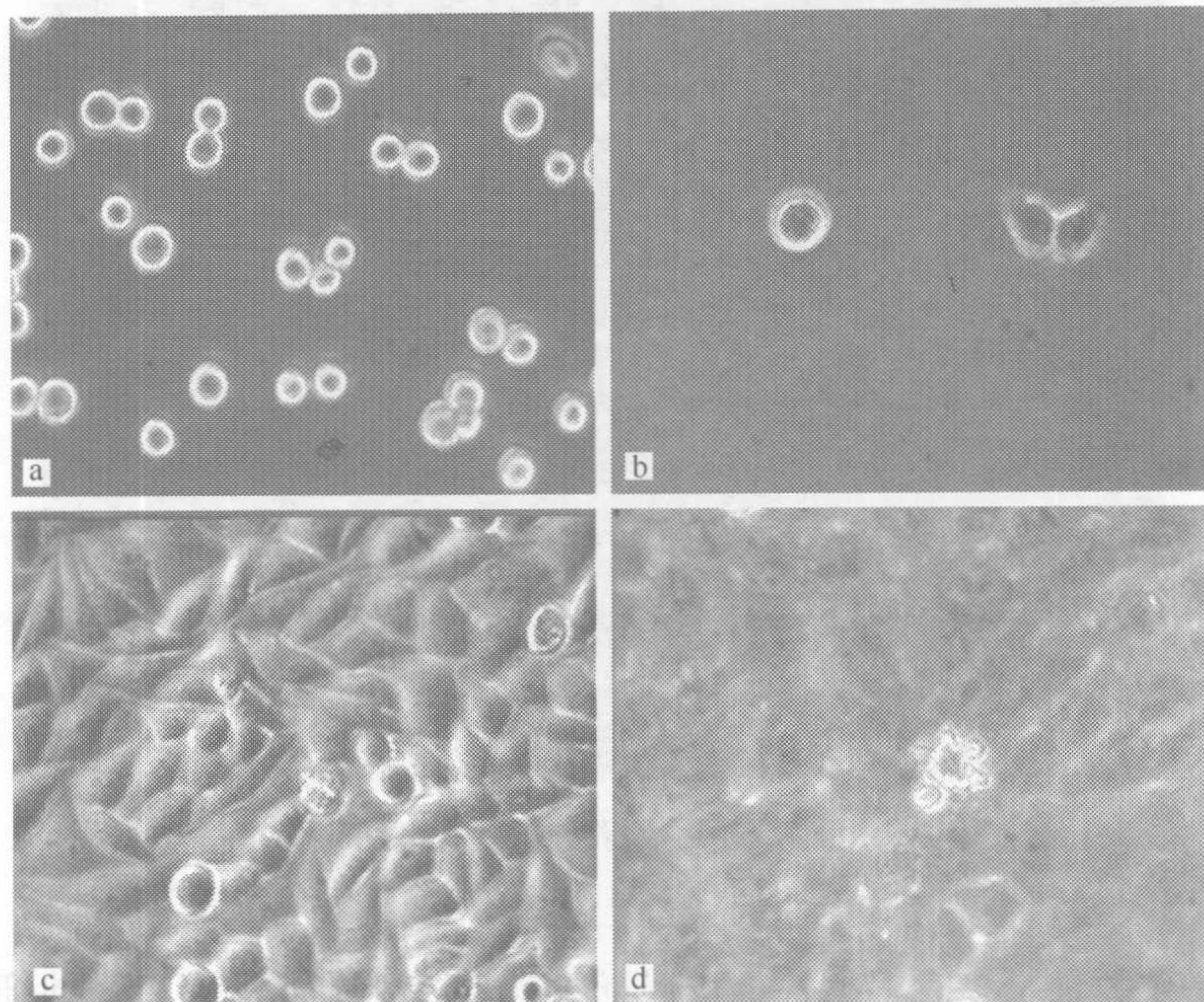


图 4-9　处于不同生长阶段的 HeLa 细胞

a. 游离期；b. 吸附期；c. 繁殖期；d. 衰退期

2. 培养细胞的形态分类

体外培养细胞根据它们是否贴附在支持物上生长的特性，可分为贴附型和悬浮型两大类。

1）贴附型

这类细胞在培养时能贴附在支持物表面生长。大多数培养细胞呈贴附型生长，依赖于贴附才能生长的细胞称贴附性细胞。当细胞贴附在支持物上之后，它们在体内时原有的特征，细胞分化现象常变得不显著。在形态上常表现单一化的现象，并常反映其胚层起源，呈现类似"返祖现象"。如来源于内、外胚层的细胞多呈上皮细胞型，来自中胚层的细胞则多呈成纤维细胞型，这种现象又与供体的年龄有密切关系，原供体越幼稚则"返祖"越明显，与细胞分化有关。因此在判定培养细胞形态时，很难再按体内细胞标准确定，仅能大致做如下分类（图 4-10）。

（1）成纤维型细胞：因细胞形态与体内成纤维细胞的形态相似而得名。细胞体呈梭形或不规则三角形，中央有卵圆形核，胞质向外伸出 2～3 个长短不同的突起。梭形细胞常沿长轴平行排列，在生长时走向多呈放射状、火焰状或旋涡状。除真正的成纤维细胞外，凡由中胚层间充质起源的组织，如心肌、平滑肌、成骨细胞等常呈该类形态。另外在培养中凡细胞形态与成纤维细胞类似者，皆可称之为成纤维型细胞。因此，细胞培养中的成纤维细胞一词是一种习惯上的称法，与体内细胞不同。

（2）上皮型细胞：这类细胞呈扁平不规则多角形，中间有圆形核，细胞紧密相连成

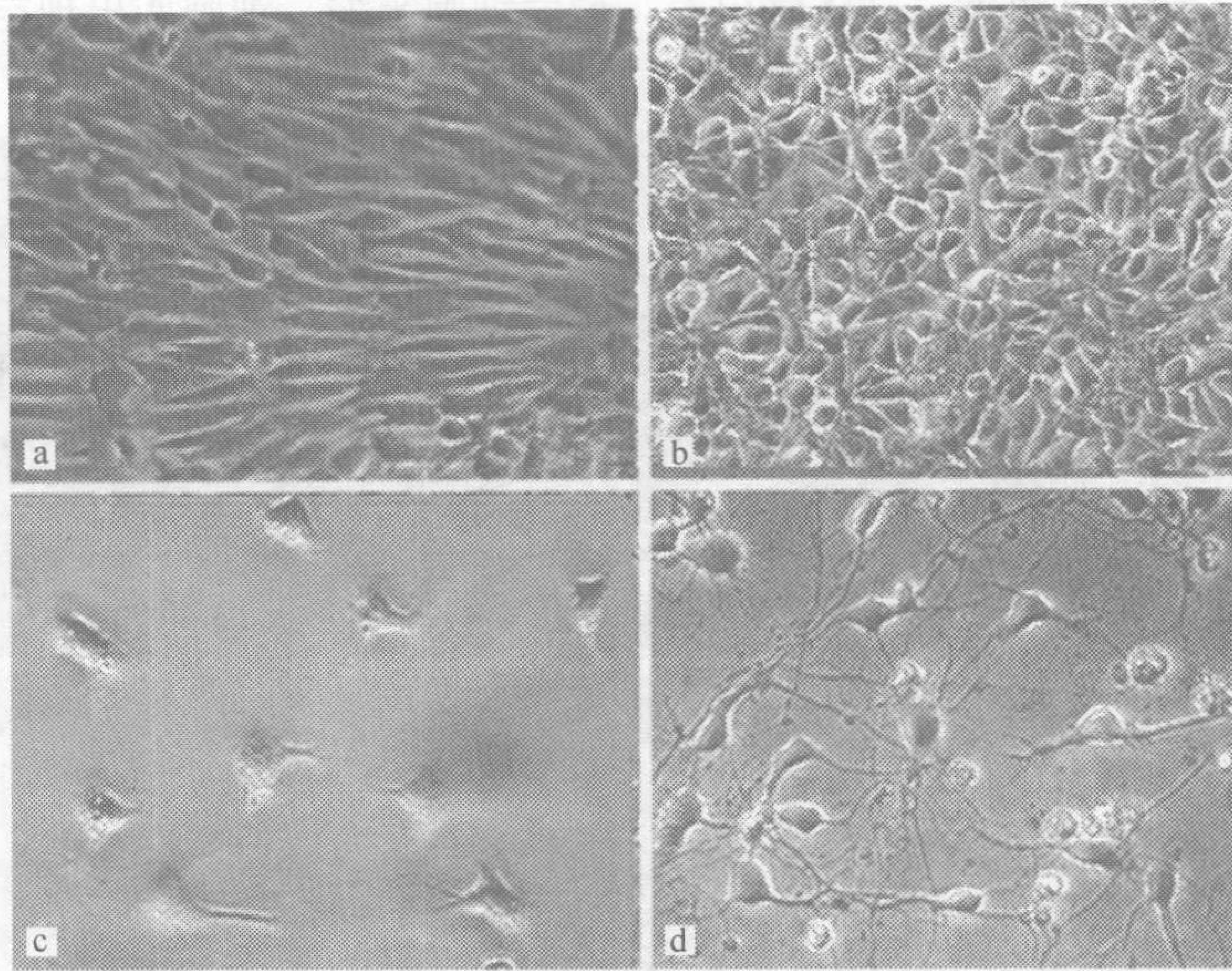


图 4-10　培养细胞的类型

a. 成纤维型细胞；b. 上皮型细胞；c. 游走型细胞；d. 多形型细胞

单层。细胞增殖数量增多时，整块上皮膜随之移动，处于上皮膜边缘的细胞多与膜相连，很少脱离细胞群单独活动。起源于内、外胚层细胞，如皮肤表皮及其衍生物、消化道上皮、肝、胰和肺泡上皮等组织细胞培养时，皆呈上皮型形态。上皮型细胞生长时，尤其是外胚层起源的细胞，细胞之间常出现拉网（netting）现象，即在构成上皮膜状生长的细胞群中，一些细胞常相互分离卷曲，致使上皮细胞膜中形成网眼状空洞。拉网的形成可能与细胞分泌透明质酸酶有关。

(3) 游走型细胞：细胞在支持物上散在生长，一般不连接成片。细胞质经常伸出伪足或突起，呈活跃的游走或变形运动，速度快而且不规则。此型细胞不很稳定，有时亦难与其他型细胞相区别。在一定条件下，由于细胞密度增大连接成片后，可呈类似多角形，或因培养基化学性质变动等影响，也可呈成纤维细胞形态。

(4) 多形型细胞：除上述三型细胞外，还有一些组织和细胞，如神经组织的细胞等，难以确定它们规律的形态，可统归入多形型细胞。

2) 悬浮型

有的细胞在培养时不贴附于支持物上，而呈悬浮状态生长，如淋巴细胞、白血病细胞、骨髓瘤细胞、腹水型恶性细胞等。细胞悬浮生长时，胞体为圆形，观察时不如贴附型方便。其优点是细胞悬浮在培养液中生长，生存空间大，允许长时间生长，能繁殖大量细胞，适于传代和进行细胞代谢等研究。

对体外培养细胞的分类，主要根据细胞在培养中的表现及描述上的方便而定。当细胞处于较好的培养条件时，形态上有相对的稳定性，在一定程度上能反映细胞的起源、正常和异常（恶性）也能区别开来，故可用作判定细胞生物学性状的指标或依据。但必须意识到，它也可受很多因素的影响而发生变化，如上皮细胞在接种后不久，因细胞数量较少，细胞可能呈星形或三角形。只有当细胞数量增多后，多角形态特点和上皮膜状

结构才逐渐变得明显起来。另外贴附型和悬浮型细胞性质也不是绝对一成不变的。当细胞发生转化后，细胞形态变化更大，如成纤维细胞转化后可变成上皮形态。另外一些类型相同细胞之间，如癌细胞等，也难以在形态上看出有什么明显区别。

（辛华）

4.3.2　培养细胞固定、染色观察的一般标本制备

细胞在体外培养过程中，既可直接动态观察活细胞，也可将细胞固定制成永久片观察。固定染色观察是细胞培养中常用的细胞形态、细胞化学研究方法。标本制好以后可以长期保存和做长时间的观察和分析。

【实验原理】

单层培养和悬浮培养的细胞都可以进行固定染色观察。生长在培养瓶（皿）内盖玻片上的单层细胞是最适宜的观察对象。标本从培养瓶中取出后，可立即进行固定染色。由于培养细胞在盖玻片上长成单层，固定时穿透快，效果好，也不需要进行包埋和切片，简化了操作过程。

【实验用品】

（1）器材：仪器设备与细胞培养相同，无菌盖玻片、24孔板、载玻片、吸管等。

（2）试剂：培养用液与原代培养相同，PBS、甲醇/乙酸固定液、FAA固定液、中性缓冲福尔马林固定液、Carnoy固定液、Giemsa染液、苏木精-伊红（HE）染液、吖啶橙荧光染液等。

（3）材料：培养在盖玻片上的HeLa细胞或其他细胞。

【方法与步骤】

1. 材料的准备

1）盖玻片的准备

用玻璃刀或小砂轮切割成小条或小方片（以能放入培养瓶或24孔培养板内为准），放入40%的硝酸溶液浸泡6h，再用水冲洗（方法同玻璃制品清洗）、烤干、高压灭菌干燥后备用。商品化的特制24孔培养板专用小盖片（有玻璃和塑料的两种）无菌处理后可以直接使用。

2）培养细胞的准备

细胞传代时，将无菌小盖片放入培养瓶或培养孔内，静置培养1～2天（细胞在盖玻片上生长状态良好），用37℃预温的PBS液轻轻漂洗两次，每次1～2min，以洗除血清，防止其干扰染色。用无菌镊子取出盖片，细胞面向上放在小培养皿或载玻片上进行固定。

悬浮培养的细胞：需先经过800r/min的低速离心5～10min，除去含血清的培养液，加入PBS液清洗离心一次，再用吸管轻轻吹打，制成细胞悬液，涂片或滴片，凉干后进行固定、染色。

3）固定

培养细胞用的固定剂与一般固定组织用的相同，但固定时间要短一些，一般10～20min即可。常用的固定剂有以下几种：

(1) 甲醇/乙酸固定液：是固定培养细胞应用最广的一种固定剂，其中甲醇具有穿透力好，易于挥发的优点，而乙酸用来固定蛋白质效果好，而且有使细胞膨胀的作用，因此，与甲醇作用相结合，能维持细胞形态不变。Giemsa 染色用此法固定效果很好，最适用于观察染色体。该固定液制备简单，宜现用现配。配制方法为：冰乙酸 1 份，甲醇 3 份。

(2) FAA 固定液：适用于盖玻片单层培养，固定效果好、配制方法为：

80%酒精　　90.0ml

冰乙酸　　5.0ml

中性福尔马林（40%甲醛，用时向瓶中加过量 $MgCO_3$ 中和）5.0ml

(3) 中性缓冲福尔马林固定液。

相当于 10%的福尔马林，可不必再调 pH，配法如下：

福尔马林（40%甲醛，用时向瓶内加过量 $MgCO_3$ 中和）10.0ml

Na_2HPO_4（无水）　　0.78g

NaH_2PO_4（无水）　　0.42g

加 0.85% NaCl　　至 100ml

(4) Carnoy 固定液。

对培养的单层细胞固定保存效果好，但穿透力差，是较好的非水溶性固定液，适用于显示细胞化学成分等方法，如黏多糖等。

纯酒精　　60.0ml

氯仿　　30.0ml

冰乙酸　　10.0ml

4）染色

培养细胞可用各种方法染色，有一般和特殊之分。一般染色为观察细胞一般形态之用。特殊染色为用于观察细胞的特殊成分和结构的染色方法。观察细胞形态常用的染色方法可分为：Giemsa 染色、苏木精-伊红（HE）染色和吖啶橙荧光染色等（染色方法见第 5 章 5.1.2 节～5.1.4 节）。

5）封片

单层培养盖玻片染色后先在显微镜下观察一下效果，满意后可进行封片。封片时先将染色后的盖片充分干燥（可在酒精灯的火焰上快速烤一下），二甲苯透明后，将细胞面向下轻轻放到滴有树胶的载玻片上，用弯头眼科镊轻轻压盖片，然后放入干燥箱干燥后备检。

【注意事项】

对培养细胞标本进行染色的时候，常会遇到细胞脱片现象，尤其是进行免疫细胞化学染色的时候。针对脱片问题，可在小盖玻片上预先包被多聚赖氨酸后再接种细胞或在细胞充分干燥后再进行固定染色。

（辛华）

4.3.3 细胞计数方法

【实验原理】

在细胞培养过程中，细胞悬液制备后，需要进行细胞计数，以确定细胞接种密度和数量，以及了解细胞存活率和增殖度。细胞计数一般使用血球计数板，按白血球计数方法进行计数。

【实验用品】

(1) 器材：与细胞培养相同，细胞计数板、细口滴管、绸布。

(2) 试剂：培养用液同细胞原代培养，0.4%台盼蓝。

(3) 材料：培养细胞悬液或冻存细胞复苏后的细胞悬液。

【方法与步骤】

1. 细胞计数

(1) 计数板处理：用无水乙醇或 95%乙醇冲洗计数板后，用干净绸布擦净，同时擦净计数板特制盖玻片，把盖玻片覆在计数板上面。

(2) 加细胞悬液：用无菌细口吸管吸取一滴细胞悬液（细胞悬液也可先进行稀释，在最后计算时应乘以稀释倍数），从计数板边缘缓缓滴入，使之充满计数板和盖片之间的空隙。注意不要使液体流到旁边的凹槽中或带有气泡，否则要重做。培养细胞计数时用的吸管加完样后不能再用，以防细胞悬液被污染。

(3) 计数：细胞加入到计数池后稍候片刻，将计数板放在低倍镜下（10×10 倍）观察计数。

(4) 计数方法：按图计算计数板的四角大方格（每个大方格又分 16 个小方格）内的细胞数。计数时，只计数完整的细胞，若聚成团的细胞则按一个细胞进行计数。在一个大方格中，如果有细胞位于线上，一般计上线细胞就不计下线细胞，计左线细胞就不计右线细胞。二次重复计数误差不应超过±5%（图 4-11）。

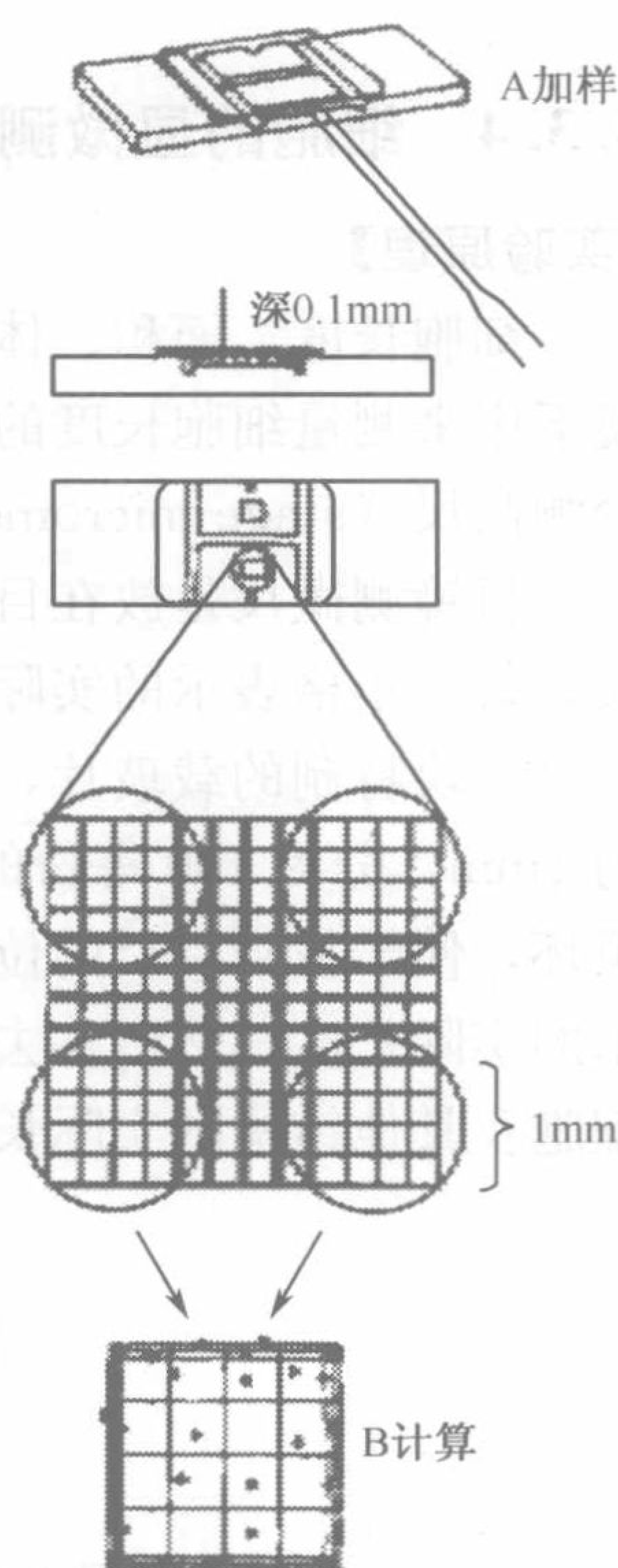


图 4-11 细胞计数法

(5) 计数的换算：计完数后，需换算出每毫升细胞悬液中的细胞数。由于计数板中每一大方格的面积为 $0.01cm^2$，高为 0.01cm，这样它的体积为 $0.0001cm^3$，即 $0.1mm^3$。由于 $1ml=1000mm^3$，所以每一大方格内细胞数×10 000= 细胞数/ml，故可按下式计算：

细胞悬液细胞数/ml= 4 个大格细胞总数/4 ×10 000

如果计数前已稀释，可再乘稀释倍数。

2. 细胞存活率计算

在细胞培养工作中，常需要了解细胞生活状态和鉴别细胞死活，例如，用酶消化制

备的细胞悬液中细胞活力的鉴别、冻存细胞复苏后的活力检测等。常用活体染料台盼蓝对细胞进行染色，以区分培养物中死细胞与活细胞的比率，便于确定细胞的生活状况。这里主要介绍用计数法测定细胞存活率。

(1) 染色：用微量加样器吸取 0.5ml 细胞悬液（无菌操作）于一小试管中，再加入 0.5ml 0.4%台盼蓝染液，用吸管轻轻吹打均匀，染色 1~2min。

(2) 计数：取一滴染色后的细胞悬液于计数板上，计数每 ml 细胞悬液中死亡细胞数（被染成蓝色的细胞）。由于在细胞悬液中加了等量的台盼蓝染液，所以计数出的细胞数要再乘以 2（稀释倍数）才是每毫升细胞悬液中死细胞的数。

(3) 细胞成活率计算：计数出的死细胞数，按下式计算出细胞存活率，细胞存活率=(细胞总数－死亡数)/ 细胞总数 ×100%。

（辛华）

4.3.4　细胞的显微测量

【实验原理】

细胞长度、面积、体积的测量是研究正常或病理组织细胞的基本方法之一。在显微镜下用来测量细胞长度的工具叫显微测量计，由目镜测微尺（ocular micrometer）和镜台测微尺（stage micrometer）组成，两尺要配合使用。

目镜测微尺是放在目镜内的一直径为 2cm 圆形玻片，其上有 100 等份小格的刻度尺。每一小格表示的实际长度随不同的显微镜、不同放大倍数的物镜而不同。镜台测微尺是一块特制的载玻片，在它的中央封固着带有精细刻度标尺的圆形盖玻片，标尺全长为 1mm，分为 100 等份的小格，每小格的长度为 0.01mm（10μm）。标尺的外围有一小黑环，便于找到标尺的位置。显微测量时，先用镜台测微尺标定目镜测微尺每小格所表示的实际长度，然后移去镜台测微尺，换上被测标本片，用目镜测微尺来测得标本片上细胞及其他结构的实际长度（图 4-12）。

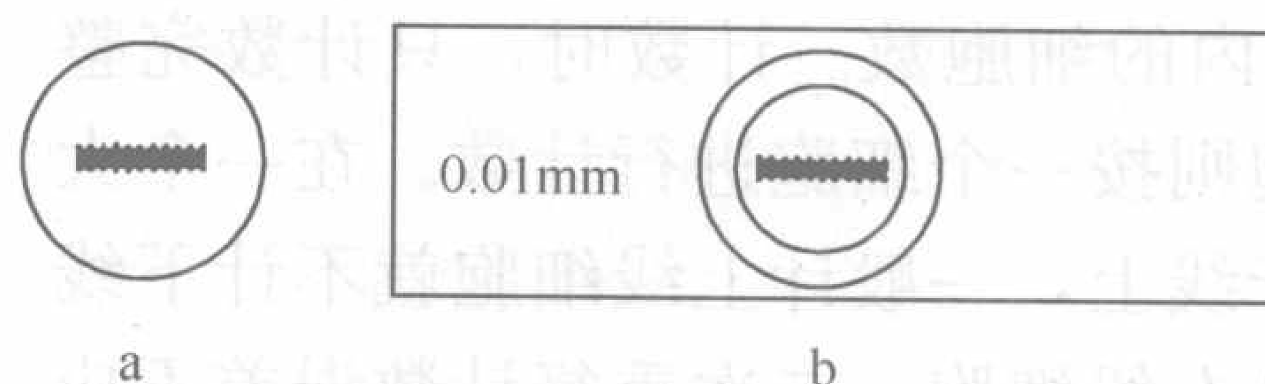


图 4-12　目镜测微尺（a）和镜台测微尺（b）外观形态

【实验用品】

(1) 仪器设备：倒置相差显微镜、普通光学显微镜、细胞培养常规设备，目镜测微尺、镜台测微尺、载玻片、无菌采血针。

(2) 试剂：培养用液同上、瑞氏（Wright）染色液、生理盐水。

(3) 材料：人肝癌细胞株 BEL-7402 细胞或人、蟾蜍血涂片。

【方法与步骤】

1. 细胞准备

(1) 培养细胞：实验前一天将细胞以 2×10^4 个/ml 接种于 24 孔培养板中，37℃、

5% CO_2、饱和湿度条件下培养。

(2) 人血涂片：用采血针刺取耳垂血，制成薄血涂片，晾干后瑞氏染色。

(3) 蟾蜍血装片：用注射器直接取蟾蜍心脏血，用生理盐水稀释后制成细胞悬液，然后取一滴细胞悬液滴在载玻璃片上，加盖玻片。

2. 细胞长度测量

(1) 取下目镜，将目镜测微尺的刻度面向下放入目镜内的视场光阑上，再旋上透镜。

(2) 将镜台测微尺盖片面朝上放在载物台上，用低倍镜观察，调节焦距看清镜台测微尺的刻度。

(3) 移动镜台测微尺，同时转动目镜，使目镜测微尺与镜台测微尺平行靠近，并将两尺的“0”点刻度线或某刻度线对齐。然后从左向右查看两尺刻度线另一重合处，记录重合线间目镜测微尺和镜台测微尺的格数。用下式计算目镜测微尺每小格表示的实际长度：

$$\text{目镜测微尺每小格实际长度} = \frac{\text{镜台测微尺格数} \times 10\mu m}{\text{目镜测微尺格数}}$$

(4) 移去镜台测微尺，换 24 孔培养板（用倒置相差显微镜观察）或瑞氏染色后的血涂片、蟾蜍血装片（普通光学显微镜），用目镜测微尺测量细胞直径所占小格数并乘以目镜测微尺每小格代表的实际长度，即为被测细胞的实际长度（图 4-13）。

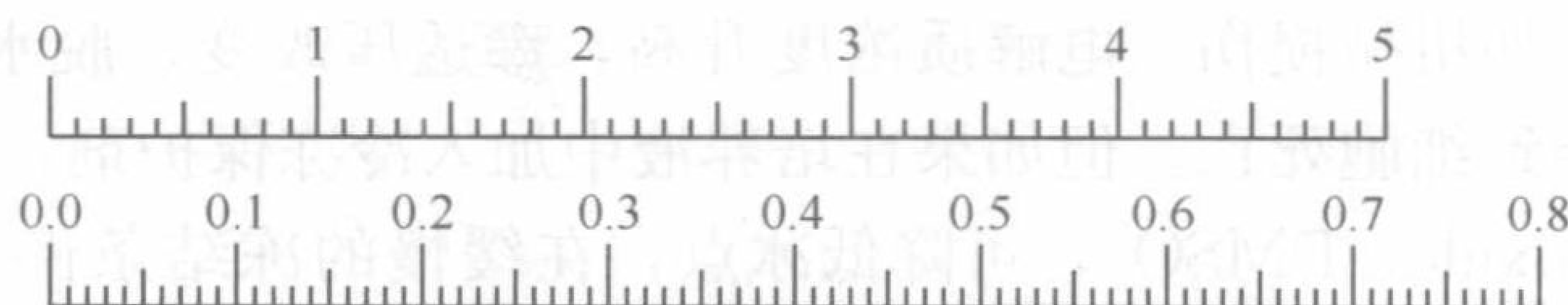


图 4-13　显微测量原理图

3. 厚度测量法

测量细胞的厚度，最简便的方法是利用显微镜上的微调焦轮上的标尺对细胞厚度进行测量。先将焦点面与被测物体的上端对齐，记下轮上的度数，然后旋转微调轮，使焦点面与下端对齐，再记下度数，两者之差，便是所测物体的厚度。此法简单但不精确。

1) 根据长度测量结果计算细胞、细胞核的体积及核质比

椭圆形　　$V=4/3\ \pi ab^2$　　（a、b 分别为长短半径）

圆球形　　$V=4/3\ \pi R^3$　　（R 为半径）

核质比　　$NP=V_n/V_c-V_n$　　（V_n为核体积，V_c为细胞体积）

2) 镜台移动尺的使用

一些较精细的显微镜的镜台上装有标本推进器，它有纵横可移动的游标尺，既可测量标本的长度，又可确定标本的位置。游标尺由主标尺和副标尺组成，主标尺刻有1mm 的刻度副标尺刻有 9/10 刻度，读数精度为 0.1mm 。读数时先看副标尺的位置，再看副标尺和主标尺的重合点即可读出。

【注意事项】

(1) 如果需换用高倍镜或油镜测量时，要用同样的方法重新计算高倍镜或油镜下目镜测微尺每小格的实际长度。

(2) 在测量时要注意将被测物体放在视野中央，因为这个位置镜像最清晰，相差最小。

(3) 每一种被测物体（细胞）需反复测量数个或数十个，采用其平均值。

（辛华）

4.4　培养细胞的冻存、复苏与运输

细胞的冷冻保存（cryopreservation）就是将体外培养物悬浮在加有冷冻保护剂的溶液中，以一定的冷冻速率降至零下某一温度（一般是−70℃以下的超低温条件）并在此温度下对其长期保存的过程，而复苏（thawing）就是以一定的复温速率将冻存的培养物恢复到常温的过程。

长期传代的细胞（细胞株或细胞系）在暂时不用的时候可以用低温冷冻的方法保存，复苏后仍然可保持其原有生物学特性和增殖活性。不同的细胞冻存的条件和方法不同，下面以 HeLa 细胞为例介绍细胞冻存的一般方法。

【实验原理】

在不加任何条件下直接冻存细胞时，细胞内外环境中的水会形成冰晶，引起细胞内发生一系列变化，如机械损伤、电解质浓度升高，渗透压改变、脱水、pH 改变，蛋白质变性等，最终导致细胞死亡。但如果在培养液中加入冷冻保护剂，如甘油或二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO），可降低冰点，在缓慢的冻结条件下，能使细胞内水分在冻结前析出细胞外，可使细胞免遭损伤。细胞冻存在−135 ℃以下的超低温条件中，能减少冰晶的形成。融解细胞时，速度要快，使之迅速通过细胞最易受损的−5℃～0℃后，细胞活力不受损害，仍能保持原有的生物学特性和增殖活性。

当前最常用的保护剂仍为二甲基亚砜（DMSO）和甘油，它们相对分子质量小、细胞无毒、溶解度大、易穿透细胞，使用浓度范围为5%～15%，常用10%的浓度冻存细胞。为保存细胞最大存活率，一般都采用慢冻快融的方法。细胞悬液的标准冷冻速度为−1℃～10℃/min，当温度降至−25℃左右，下降速度可增至−10～−5℃/min，到−100℃时，可迅速投入液氮中。细胞在液氮中保存温度可达−196℃，储存时间几乎是无限的。

【实验用品】

(1) 器材与用品：同细胞培养、液氮罐、无菌冷冻管。

(2) 试剂：冷冻保护剂［二甲基亚砜（DMSO）或甘油］、小牛血清、0.25%胰蛋白酶、20%血清的培养液。

(3) 材料：HeLa 细胞或其他细胞。

【方法与步骤】

1. 细胞的冻存方法

(1) 取生长旺盛的细胞（对数生长期），倾弃培养液，加入适量经 37℃ 预温的

0.25%胰蛋白酶，在37℃条件下消化分散细胞（时间同传代）。

（2）弃消化液，加入2～4ml含20%血清的培养液，终止胰蛋白酶的消化作用。

（3）吸管吹打分散细胞，移入离心管中，平衡后800r/min离心10min，弃上清液。

（4）加2～4ml含20%血清的培养液，重新悬浮细胞，用细胞计数板计算细胞浓度，用培养液将细胞浓度调整到2×10^6～5×10^6个/ml，放置冰浴中。

（5）用同样的完全培养液制成含20% DMSO的冷冻保护液，放置冰浴中。

（6）将等量的冷冻保护液滴加于等量的细胞悬液中，摇均匀，制成含10%DMSO的冷细胞悬液，细胞浓度为1×10^6～2×10^6个/ml细胞。

（7）将细胞悬液分别移到冷冻管中，每管1～1.5ml（事先在管上标明细胞株名称、日期、浓度等），旋紧管盖，放入纱布小袋中进行冻存。纱布袋一端系以线绳，末端扎有小牌，注明细胞名称、冻存日期、浓度等，以便查找。

（8）进行冻存时一般以1～10℃/min的速度下降冻结为宜，可用程序控制冷冻仪控制。如果没有该设备，可采用以下方法进行冻存。

方法1：将冷冻管先置于4℃冰箱1～2h，然后移至−60～−40℃低温冰箱1～24h，然后立即投入液氮中（−196℃）。

方法2：将冷冻管从4℃冰箱取出后，悬在液氮罐口，然后按−1℃/min速度，在30～40min内，下降到液氮面，再停30min后，直接投入液氮中。

2. 细胞的复苏

细胞复苏与冻存的要求相反，采用快融的方法。

（1）迅速将冷冻管取出，立即投入37～40 ℃温水中，并充分摇动，使其迅速融化，一般1min左右即可完成。

（2）清洗：在超净工作台内，将冷冻管中细胞悬液移至含5ml培养液的离心管内，500～1000r/min离心5min，弃上清，加入培养液漂洗，离心后加入适量培养液，用吸管轻轻吹打制成细胞悬液。

（3）培养：将细胞悬液（5×10^5/ml细胞接种浓度）移入培养瓶内，置37℃温箱培养。次日更换一次培养液后，再继续培养。

3. 培养细胞的运输

培养细胞的交流、交换、购买已成为生命科学研究中一个重要环节。从其他研究机构索取细胞时，应注意了解细胞的生物学特性、培养液及培养时注意事项以及细胞冻存条件等详细资料。

装运细胞的方法有两种，一种为冷冻储存运输，即利用特殊容器内盛液氮或干冰冻存，保存效果较好，但较麻烦；另一简单的方法为细胞单层的运输，可根据路程时间来选择细胞数量，一般以细胞长满1/3～1/2瓶底为宜。去掉旧培养液，补充新培养液到达瓶颈部，保留少许空间，拧紧瓶盖，并用胶带密封。运送时注意防震、防压。一般不超过四、五天到达目的地的情况下，对细胞活力无严重影响。到达目的地后倒出多余的培养液，仅保留维持细胞生长所需液量，37 ℃培养，次日传代。

如短距离携带（市内），可仅保留少量培养液覆盖细胞单层，以防干燥，同时注意保温。

【注意事项】

(1) DMSO可高压灭菌(8lb 15min),也可用无菌吸管在超净工作台内,从DMSO瓶中吸出(不要碰瓶口与瓶壁),加入培养液中,由于微生物不会在DMSO中生长,只要无菌操作得当,不会发生污染。

(2) DMSO是有机溶剂,不可与橡皮接触。此外,使用时要避免与皮肤接触,因为它是一种很强的皮肤穿透剂。

(3) 悬浮培养细胞的冻存法与前所述相同,只是不必经胰蛋白酶消化步骤。

(辛华)

4.5 培养细胞增殖动力学方法

培养中的细胞生长、繁殖和死亡是一个动态过程,这一过程的时间和数量表达可充分反映出培养细胞群体动力学过程。常用的分析方法包括生长曲线的绘制、分裂指数测定、细胞克隆(集落)形成试验等。

4.5.1 生长曲线的测定

【实验原理】

能在体外连续培养的细胞都有自身稳定的生长、增殖特性,生长曲线就是观察细胞生长、增殖最常用的方法。它通过细胞记数的方法来测定细胞绝对增长数值,用以了解细胞生长增殖规律。生长曲线测定常用于细胞建系和药物对肿瘤细胞的杀伤作用研究。

【实验用品】

(1) 器材:CO_2培养箱、超净工作台、显微镜、血球计数板、培养瓶、24孔培养板、吸管等。

(2) 试剂:1640培养液、小牛血清、0.25%胰蛋白酶、0.02%EDTA、75%乙醇。

(3) 材料:HeLa细胞、肝癌BEL-7402细胞。

【方法与步骤】

1. 细胞悬液制备

取生长状态良好的细胞,采用一般传代方法消化细胞,制成细胞悬液。

2. 接种细胞

在各培养瓶(或各孔/24孔板)内准确接种相同数量的细胞。常用接种密度为$1\times10^5\sim1\times10^6$细胞/ml。

3. 计数

每天取3瓶(或3个孔)计数,测出每瓶(或每孔)中的细胞总数,求出每组平均值,持续计数7天(也可根据需要而定)。

4. 绘制生长曲线

将每天计数所得的细胞浓度标在对数坐标纸上,然后将各点连成曲线,即为生长

曲线。

【结果分析】

标准的生长曲线近似“S”形（图 4-14），一般在传代后第一天细胞数有所减少，再经过几天的潜伏期，然后进入对数生长期。达到平台期后生长稳定，最后进入衰老期。

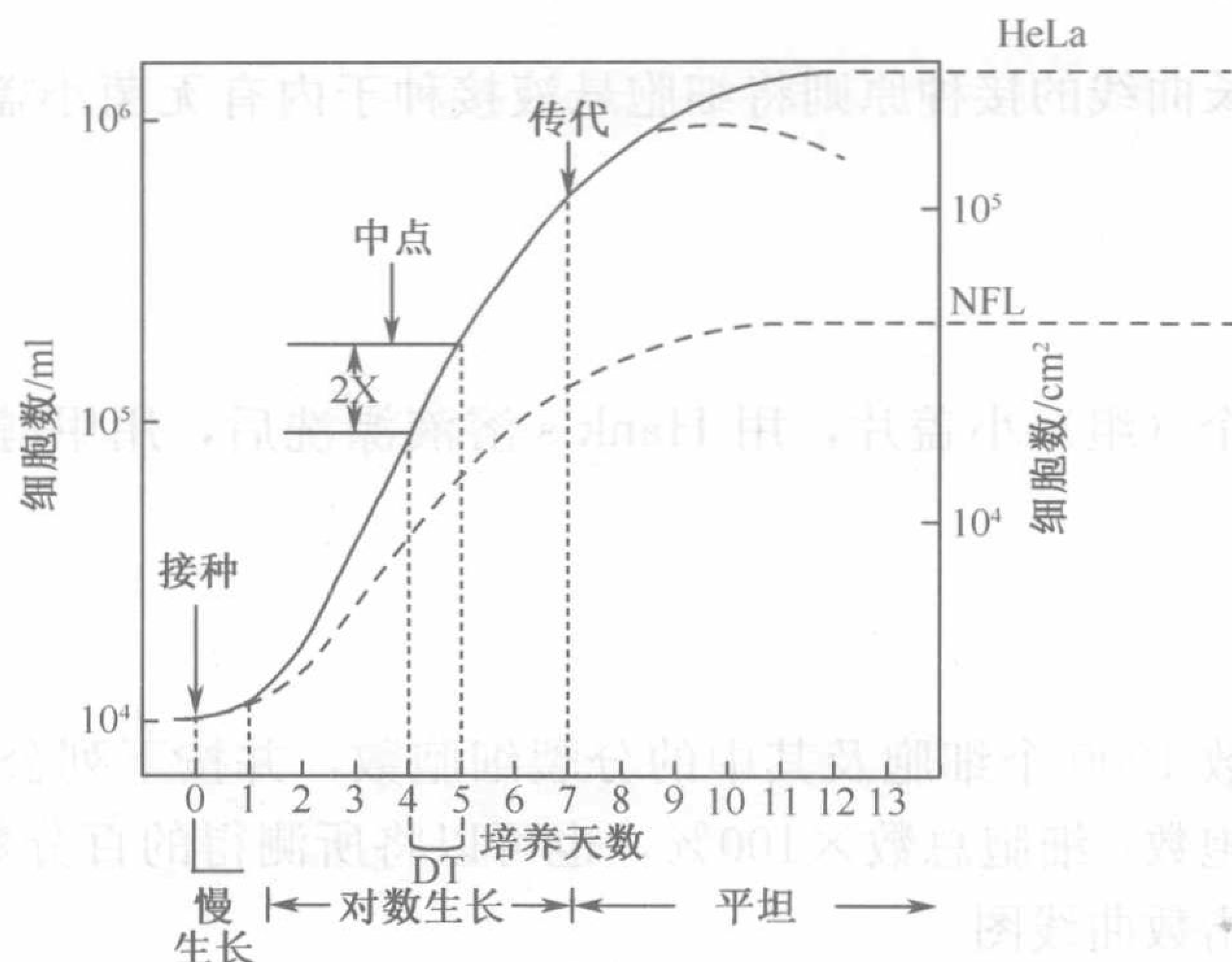


图 4-14　细胞生长周期曲线

DT：倍增时间（doubling time）

在生长曲线上细胞数量增加一倍所需要的时间称为细胞倍增时间。细胞倍增时间区间即细胞对数生长期。细胞传代和各种实验等多应在此区进行。

【注意事项】

（1）细胞接种时，每瓶（或每孔）接种的细胞总数和加入的培养液要求一致。细胞接种数量不能过多，也不能太少。一般接种数量以 7～10 天能长满而不发生生长抑制为度。

（2）计数时易出现误差（20%～30%），为提高准确性，每瓶（或每孔）应计数2～3 次。

（辛华）

4.5.2　分裂指数测定

【实验原理】

分裂指数是指在细胞群体中分裂期细胞所占的百分率，用以表示细胞增殖旺盛的程度。一般要观察和计数 1000 个细胞中的细胞分裂相数。由于细胞分裂是一动态过程，分裂期时间很短，一般延续时间为 0.5～2h，故通常用盖片培养法，定时取出盖片进行固定染色后进行观察计数，也可制成曲线。

【实验用品】

（1）器材：细胞培养传代用品同上，无菌小盖片。

（2）试剂：同细胞传代培养液甲醇、Giemsa 染液、树胶。

（3）材料：细胞株：HeLa 细胞或其他细胞株。

【方法与步骤】

1. 接种细胞

按测定细胞生长曲线的接种原则将细胞悬液接种于内有无菌小盖片的培养瓶或 24 孔培养板孔内。

2. 固定染色

每 24h 取出一个（组）小盖片，用 Hank's 溶液漂洗后，用甲醇固定，Giemsa 染色，树胶封片。

3. 计数

在显微镜下计数 1000 个细胞及其中的分裂细胞数，并按下列公式计算分裂指数：分裂指数＝分裂细胞数/ 细胞总数×100%，也可以将所测得的百分数逐日按顺序绘制成图，即细胞分裂指数曲线图。

【注意事项】

（1）细胞分裂指数的观察要掌握好分裂相标准，其中主要是确定好划分间期和前期、末期和间期的界线，避免人为误差。

（2）细胞在盖片上的密度常不均匀，故分裂相多少可能不同，观察时对每一时间组的玻片各选多、中、少三个密度近似区域计数，以减少误差。

（3）细胞分裂指数曲线与生长曲线的趋势基本类似，但不完全相同，如当细胞增长达饱和密度并进入停止期后，细胞数值很大而分裂相可能完全消失。

（辛华）

4.5.3　克隆（集落）形成试验

【实验原理】

克隆（集落）形成试验（colony forming test）是测定单个细胞增殖能力的有效方法之一。单个细胞在体外持续 6 代以上，其后代所组成的细胞群，称为克隆或集落，这时每个克隆可含有 50 个以上个细胞，大小为 0.3 ～1.0mm。通过计数克隆形成率，可对单个细胞的增殖潜力做定量分析，了解细胞的增殖能力和对生存环境的适应性。克隆形成率高者其独立生存能力强。该实验常常用来确定抗癌药物对肿瘤的杀伤作用。常用的方法有：平板克隆（集落）形成试验和软琼脂克隆（集落）形成试验。前者主要适用于贴壁生长的细胞，包括培养的肿瘤细胞和正常细胞。后者常用于非贴壁依赖性（悬浮型）生长的细胞，如造血干细胞、肿瘤细胞系和转化细胞系等。正常细胞在悬浮状态下不能增殖，因此不适用于软琼脂克隆形成试验。本节只介绍平板克隆形成试验方法，软琼脂克隆（集落）形成实验可参见第 13 章人造血干细胞/组细胞的培养和检测技术。

【实验用品】

（1）实验用品：φ60mm 培养皿，其他细胞培养用品同细胞传代培养。

（2）试剂：培养用液和固定、染色液。

（3）材料：肝癌 BEL-7402 细胞或 HeLa 细胞。

【方法与步骤】

1. 细胞悬液制备

用一般传代方法将对数生长期的单层培养细胞分散成单细胞悬液，计数。

2. 接种细胞

将细胞悬液作梯度倍数稀释，以适当的细胞密度接种于培养皿（φ60mm）中。一般可按每皿含 50 个、100 个、200 个细胞的梯度密度，分别接种于含 10ml 培养液的培养皿中，轻轻晃动，使细胞分散均匀。

3. 细胞培养

将培养皿移入 CO_2 培养箱，在 37℃ 、5%CO_2 及饱和湿度环境下，静置培养，2～3 周。

4. 染色

当培养皿中出现肉眼可见的克隆时，终止培养。弃去培养液，用 Hank's 溶液漂洗后，用纯甲醇固定 15min，弃固定液后 Giemsa 染色 10～30min，流水冲去染液，空气干燥。

5. 计数

在低倍显微镜或解剖镜下计算克隆数，（一般大于 50 个细胞以上者算一个克隆）。取 3～5 皿克隆数的平均值，并按下列公式计算：克隆形成率＝平均克隆数/种入的单个细胞数×100%。

【注意事项】

（1）制备细胞悬液时，细胞必须分散均匀，单个细胞百分率至少在 90%以上，否则试验误差大。

（2）在培养早期细胞还没有充分贴壁前，不要晃动培养皿。

（3）由于培养时间较长，应注意培养液的 pH 变化，适时换液。

（4）开放培养应该注意培养箱清洁，防止污染。

4.5.4　BrdU 掺入法测定细胞增殖指数

【实验原理】

5-溴脱氧尿嘧啶核苷（bromodeoxyuridine，BrdU）是胸腺嘧啶的衍生物，可以通过与胸腺嘧啶竞争而掺入到 S 期细胞的单链 DNA 核苷酸序列中，再利用抗 BrdU 单克隆抗体显示增殖细胞核。BrdU 也可以在同一细胞内结合其他特异标记物进行双重免疫荧光染色，来判断某种细胞的增殖能力。本实验将通过 BrdU 荧光染色及 DAPI 复染来

介绍细胞增殖指数的检测方法。

【实验用品】

1）实验器材

细胞培养传代用品、荧光显微镜、冰箱、微量加样器、湿盒、吸水纸、盖玻片和载玻片。

2）试剂

（1）0.01mol/L PBS 溶液（pH7.4）：NaCl 8.0g，KCl 0.2g，Na_2HPO_4 1.15g，KH_2PO_4 0.2g，蒸馏水定容至1000ml。

（2）4%多聚甲醛。

（3）0.3%Triton X-100。

（4）10%正常山羊血清封闭液。

（5）碱性甘油溶液：碳酸缓冲液1份与甘油（试剂级，无荧光）9份混合均匀。

（6）2μg/ml DAPI 染液：DAPI 2mg，溶于 2ml 双蒸水中，配成 1mg/ml 的浓缩液，4℃冰箱中，保存；用时取浓缩液 10μl，用双蒸水稀释到 5ml，即为 2μg/ml DAPI 染液。

（7）BrdU 溶液、小鼠抗 BrdU 单克隆抗体。

（8）Cy3 标记的山羊抗小鼠的荧光二抗。

3）材料

培养的对数生长期细胞爬片。

【方法与步骤】

（1）在细胞培养终止前 4h 加入终浓度为 10μmol/L 的 BrdU 溶液，4h 后取出细胞爬片。

（2）用 0.01mol/L PBS 冲洗 3 次，每次 5min。

（3）吸弃 PBS，加入 70%乙醇固定细胞 20min。

（4）吸弃乙醇，用 0.01mol/L PBS 冲洗 3 次，每次 5min。

（5）吸弃 PBS，加入 0.3%Triton X-100 溶液室温下处理 10min。

（6）吸弃 Triton X-100，用 0.01mol/L PBS 冲洗 3 次，每次 5min。

（7）吸弃 PBS，加入 2mol/L 盐酸溶液，37℃下酸化 30min。

（8）吸弃盐酸，用 0.01mol/L PBS 冲洗 3 次，每次 5min。

（9）吸弃 PBS，并用吸水纸吸掉细胞爬片上多余的液体，然后在细胞爬片上滴加 10%正常山羊血清封闭液，然后将爬片放入湿盒，37℃下封闭 30min。

（10）用吸水纸吸去爬片上的封闭液，然后滴加稀释好的抗 BrdU 的一抗，以抗体溶液盖过整张细胞爬片而又不从爬片溢出为宜，将爬片放入湿盒，4℃冰箱孵育过夜。

（11）吸取并回收一抗，用 0.01mol/L PBS 冲洗 3 次，每次 5min。

（12）吸弃 PBS，并用吸水纸吸去细胞爬片上的多余液体，然后在爬片上滴加稀释好的二抗溶液，将爬片放入湿盒，37℃下避光孵育 30min。

（13）吸弃二抗，然后在爬片上滴加 2μg/ml DAPI 染液，室温避光作用 5min。

（14）吸弃 DAPI 染液，用 0.01mol/L PBS 冲洗 6 次，每次 5min。

（15）滴加约 5μl 碱性甘油于载玻片上，将爬片细胞面朝下盖于碱性甘油中，应尽量避免产生气泡，封固后在荧光显微镜下（选用不同波长滤光片）观察。

（16）增殖指数（proliferation index，PI）的计算：

随机计数超过 500 个 DAPI 阳性细胞，并同时计数这些细胞中 BrdU 阳性细胞的个数，然后按下列公式计算：

细胞增殖指数＝BrdU 阳性细胞数/DAPI 阳性细胞数×100％

【结果与观察】

所有细胞的细胞核被 DAPI 染色显示蓝色荧光，BrdU 掺入的细胞核显示红色荧光（图 4-15）。

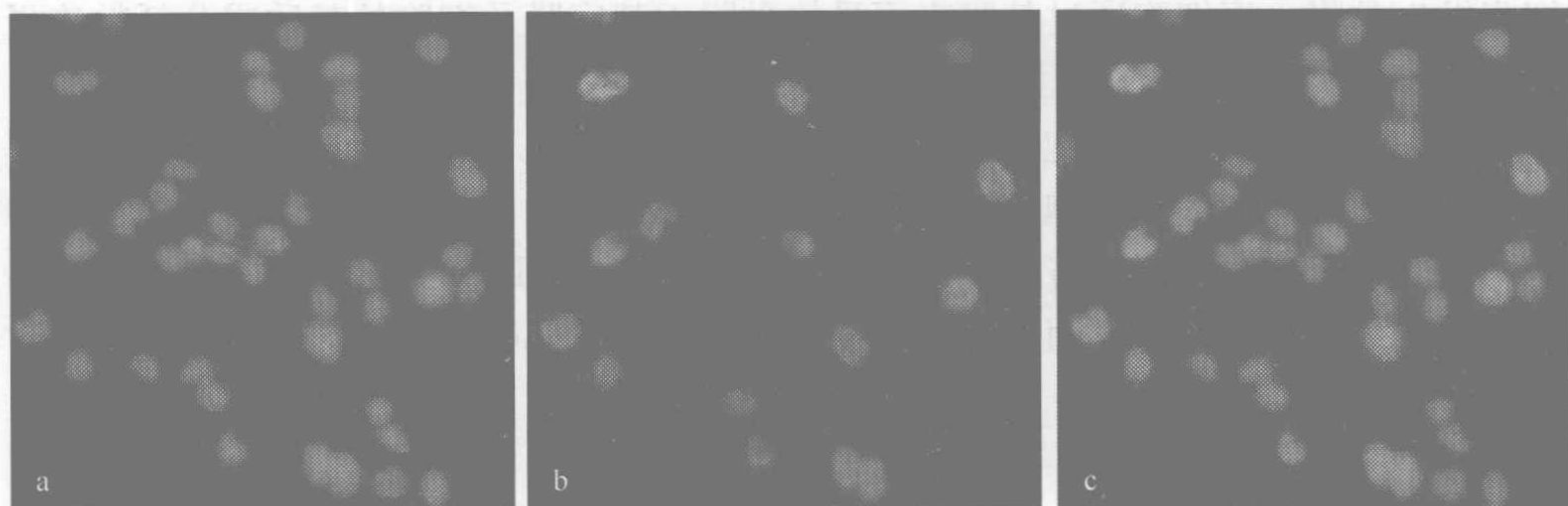


图 4-15　培养细胞 BrdU 染色及 DAPI 复染的荧光照片

a. DAPI 染色阳性细胞核；b. BrdU 掺入阳性细胞核；c. DAPI＋BrdU 叠加后细胞核

【注意事项】

（1）为了节省抗体及尽量避免假阳性结果的出现，使用的一抗及二抗的稀释度均需经预实验选择好，然后再进行增殖指数的测定工作。

（2）由于盐酸具有较大的挥发性，故每次使用前需要临时配制新鲜的 2mol/L 盐酸，否则，可能会由于酸化不充分得不到阳性结果。

（孙涛）

4.6　肿瘤细胞黏附和侵袭能力的体外检测方法

肿瘤侵袭是指恶性肿瘤细胞从其起源部位沿组织间隙向周围组织浸润的过程，其标志是肿瘤细胞突破基底膜，肿瘤侵袭是肿瘤细胞与周围间质相互作用的结果。肿瘤细胞侵袭浸润细胞外基质的步骤是：瘤细胞通过与细胞膜上的特异性受体与基质内糖蛋白黏附成分层粘连蛋白（LN）或纤粘连蛋白（FN）结合，使瘤细胞首先与基底膜、然后与其他间质成分发生黏附；黏附的瘤细胞和受其刺激的宿主细胞分泌蛋白酶，继而蛋白酶被激活，降解瘤细胞邻近的细胞外基质，特别是基底膜；突破基底膜后，瘤细胞才能迁移。细胞基质的降解，是继瘤细胞与基质黏附后发生的重要变化，也是瘤细胞迁移、浸润基质的前提。肿瘤细胞的侵袭与转移是恶性肿瘤威胁患者健康乃至生命的主要原因，而肿瘤侵袭是肿瘤扩散的第一步。因此研究肿瘤侵袭的规律及其发生机制，对恶性肿瘤的防治有重要意义。

4.6.1 肿瘤细胞的黏附能力分析实验

【实验原理】

肿瘤细胞的黏附能力与癌细胞的侵袭和转移能力密切相关。恶性肿瘤细胞在侵袭和转移过程中，与宿主细胞组织成分发生多次黏附，以癌细胞的血源性散播为例，欲在远隔靶器官形成转移瘤，首先是与靶器官的血管内皮细胞发生黏附；当癌细胞穿过血管壁至细胞外基质时，又与细胞外基质（包括基底膜）发生黏附；在靶器官内生长，又同实质细胞发生黏附。瘤细胞通过其膜表面受体黏附于基底膜及细胞外基质成分纤粘连蛋白（FN）、层粘连蛋白（LN）和Ⅳ型胶原上。

本方法用于测定肿瘤细胞与基底膜成分黏附的能力。将 Matrigel（人工基底膜）、FN 和 LN 分别铺于 96 孔细胞培养板中，待其干燥后在 96 孔板中接种适当密度的肿瘤细胞，共同孵育一定时间，将未黏附的细胞洗掉，用 MTT 法测定每孔中的黏附细胞数。此方法简单、快捷，可用于抗肿瘤侵袭药物的大规模筛选，也可用于肿瘤细胞对不同基底膜成分的黏附分析。

【实验用品】

（1）器材：超净工作台、CO_2 培养箱、酶标仪、96 孔细胞培养板以及其他细胞培养常规用品。

（2）试剂与药品：RPMI 1640 培养液、胎牛血清（FBS），Matrigel、FN、LN、四甲基噻唑蓝（MTT）、牛血清白蛋白（BSA）、PBS、DMSO。

注：Matrigel、FN 和 LN 均用无菌去离子水配制。

（3）材料：人高转移肺癌细胞株 PG。

【方法与步骤】

（1）人高转移肺癌细胞 PG 细胞在含 10%FBS 的 RPMI 1640 中常规培养。

（2）在 96 孔板的孔中分别滴加 25μl 80μg/ml 的 FN 或 LN 以及 Matrigel，使之覆盖整个孔底，置超净工作台中室温过夜干燥。

（3）用前将分别铺好 LN、FN 和 Matrigel 的 96 孔板的孔中加入含 2%BSA 的 RPMI 1640 培养液，每孔 100μl，放置细胞培养箱中封阻 1h 后用 PBS 冲洗，彻底吸弃 PBS。

（4）取对数生长期 PG 细胞，用 0.25%胰蛋白酶消化、800*g* 离心 5min，弃上清，用含 0.1%BSA 的 RPMI 1640 将 PG 细胞重悬，调整密度至 4×10^5个/ml，接种在铺被好的 96 孔细胞培养板中，每孔加入 100μl 细胞悬液，置于 37℃、5%CO_2、饱和湿度培养箱中培养 1h。

（5）吸弃培养液，每孔中加入 150μl PBS 冲洗三遍，以去除未黏附的细胞。

（6）加入 100μl 含 10%MTT（5mg/ml）的 RPMI 1640 培养液，置于 37℃、5%CO_2、饱和湿度培养箱孵育 4h。

（7）弃去含 MTT 培养液，加入 150μl DMSO，振荡混匀 10min 左右，至无结晶。

（8）酶标仪于 570nm 测定吸光值。

【结果与观察】

本实验适应于肿瘤细胞黏附能力测定及抗肿瘤黏附药物的筛选，在抗肿瘤黏附药物筛选时，以阴性对照组作为100％黏附率，计算实验组的相对黏附率：

相对黏附率＝(OD 药物处理组/OD 阴性对照组)×100％(以空白组孔调零)

【注意事项】

(1) 不同的肿瘤细胞的黏附率不同，需选择不同的细胞接种密度和黏附孵育时间。

(2) 每组设置 3～5 个平行孔，同时要设置空白组孔。

(朱庆均)

4.6.2　细胞侵袭重建基底膜实验

【实验原理】

基底膜是普遍存在于上皮下、内皮下和间皮等的一种连续的细胞外基质成分构成的膜性结构，主要含层粘连蛋白（LN）和Ⅳ型胶原。局部蛋白质水解导致基底膜降解、断裂、有利于瘤细胞穿出。常用的人工重建基底膜材料为 Matrigel，主要成分为层粘连蛋白和Ⅳ型胶原。Transwell 小室外形为可以放置在培养板中的小杯子（图 4-16），小杯子的底层为聚碳酸酯微孔滤膜。将 Matrigel 铺在聚碳酸酯膜上（方法同前），可以在培养液中重建形成与天然基底膜相似的膜结构，具有侵袭能力的细胞可以在趋化剂诱导下穿透滤膜。通过计数穿过滤膜的细胞数可以在体外检测肿瘤细胞的侵袭能力以及药物对肿瘤细胞侵袭能力的影响。

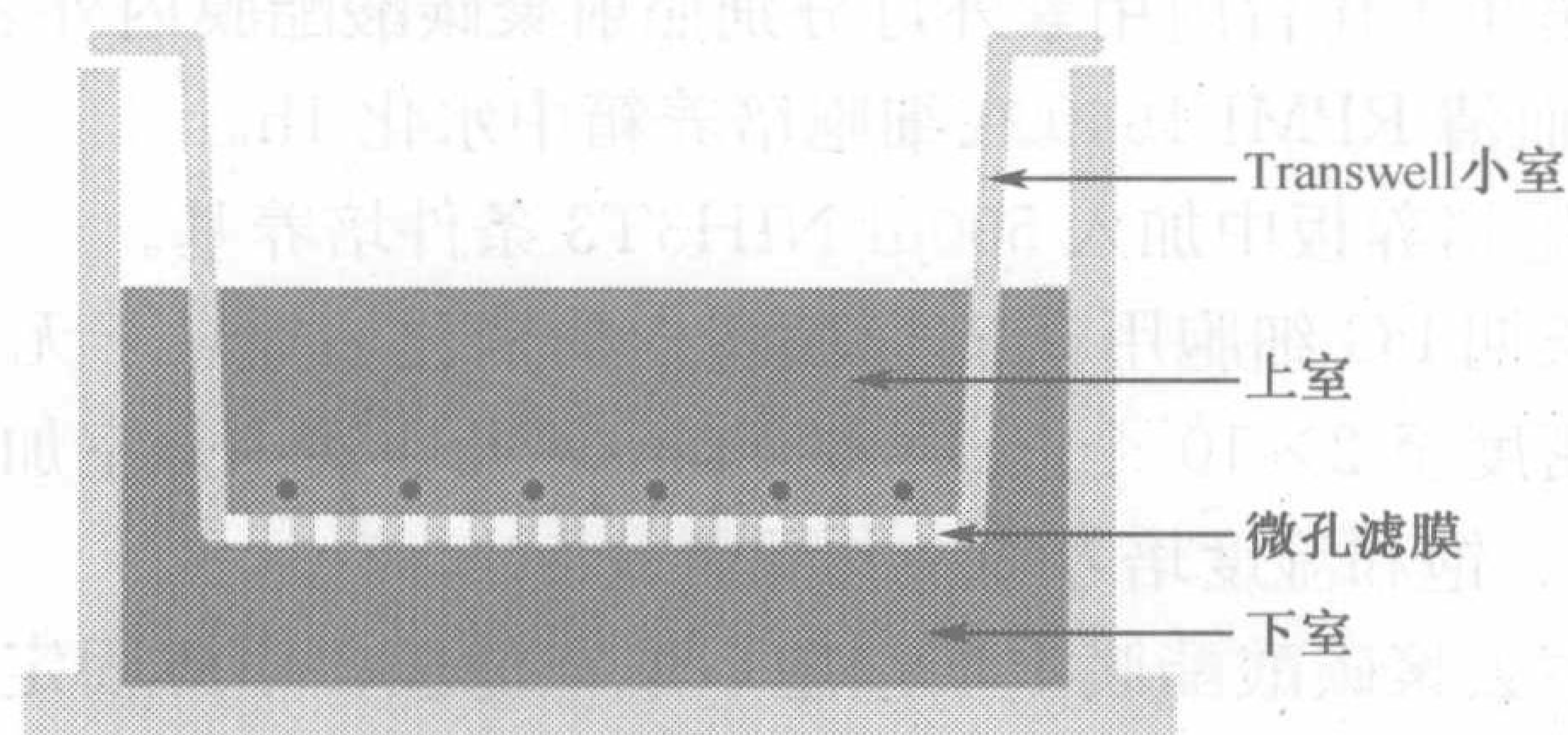


图 4-16　Transwell 小室示意图

【实验用品】

(1) 器材：超净工作台、CO_2 培养箱、带 Transwell 小室的 24 孔板（8μm 或 12μm 孔径滤膜，Corning 公司产品）、棉签、载玻片、盖玻片及酒精灯。

(2) 试剂与药品：RPMI 1640 培养液 、胎牛血清（FBS）、Matrigel、FN、牛血清白蛋白（BSA）、0.25％胰蛋白酶、Giemsa 染液、中性树胶。

注：Matrigel、FN 均用无菌去离子水配制。

(3) 材料：人高转移肺癌细胞株 PG 及小鼠成纤维细胞株 NIH3T3。

【方法与步骤】

方法 1

(1) 人高转移肺癌细胞株 PG 在含 10％FBS 的 RPMI 1640 中常规培养。

(2) 在聚碳酸酯滤膜外表面涂 40μl 的 FN (125μg/ml) 作为趋化因子，内表面涂 40μl 的 Matrigel (500μg/ml)，在超净工作台内过夜干燥。

(3) 铺被好的 Transwell 小室使用前在超净工作台内用紫外灯分别照射聚碳酸酯膜内外表面 30min，然后在上室内加入 50μl 无血清 RPMI 1640 置于细胞培养箱中水化 1h。

(4) 在 24 孔细胞培养板中加入 500μl 含 5%FBS 的 RPMI 1640 培养液。

(5) 取对数生长期 PG 细胞用 0.25%胰蛋白酶消化，重悬于含 0.1%BSA 的 RPMI 1640 培养液中，调整细胞密度至 2×10^5个/ml，在 Transwell 小室中每室加入 100μl 细胞悬液，置于 37℃、5%CO_2、饱和湿度培养箱中共同孵育 12h。

(6) 用棉签轻轻擦去聚碳酸酯膜上层细胞后取下滤膜，甲醇固定 10min，Giemsa 染色，中性树胶封片。

(7) 于 200 倍光学显微镜下计数侵袭细胞数，每膜计数上下左右中 5 个视野的穿透细胞数，计算平均值，每组设 3 个平行孔。

方法 2

(1) 小鼠成纤维细胞株 NIT3T3 在含 10%FBS 的 RPMI 1640 中常规培养至对数生长期，用 0.25%胰蛋白酶消化收集细胞，调整细胞密度为 4×10^5个/ml，在无血清 RPMI 1640 培养液中培养 24h，收集培养液作为条件培养基，分装冻存备用。

(2) 人高转移肺癌细胞 PG 细胞在含 10%FBS 的 RPMI 1640 中常规培养。

(3) 在聚碳酸酯滤膜内表面涂 40μl 的 Matrigel (500μg/ml)，在超净工作台内干燥过夜。

(4) 使用前在超净工作台内用紫外灯分别照射聚碳酸酯膜内外表面 30min，然后在上室内加入 50μl 无血清 RPMI 1640 在细胞培养箱中水化 1h。

(5) 在 24 孔细胞培养板中加入 500μl NIH3T3 条件培养基。

(6) 取对数生长期 PG 细胞用 0.25%胰蛋白酶消化，重悬于无血清 RPMI 1640 培养液中，调整细胞密度至 2×10^5个/ml，在 Transwell 小室中每室加入 100μl 细胞悬液，置于 37℃、5%CO_2、饱和湿度培养箱中共同孵育 12h。

(7) 棉签轻轻擦去聚碳酸酯膜上层细胞后取下滤膜，甲醇固定 10min，Giemsa 染色，中性树胶封片。

(8) 于 200 倍光学显微镜下计数侵袭细胞数，每张膜计数上下左右中 5 个视野的穿透细胞数，计算平均值，每组设 3 个平行孔。

【结果与观察】

具有侵袭能力的肿瘤细胞可以降解 Matrigel 并穿过滤膜微孔，贴附在聚碳酸酯膜下表面。用 Giemsa 染色可以在显微镜下观察计数穿过滤膜微孔的细胞数（图 4-17）。

如果检测药物抗肿瘤侵袭的能力，可以用下式计算：

抑制率=(阴性对照组平均侵袭细胞数－实验药物组平均侵袭细胞数)/ 阴性对照组平均侵袭细胞数×100%。

【注意事项】

(1) 不同的肿瘤细胞侵袭能力不同，其穿膜时间也有差别，对不同的肿瘤细胞需通过预实验摸出最佳的接种细胞密度及侵袭孵育时间。

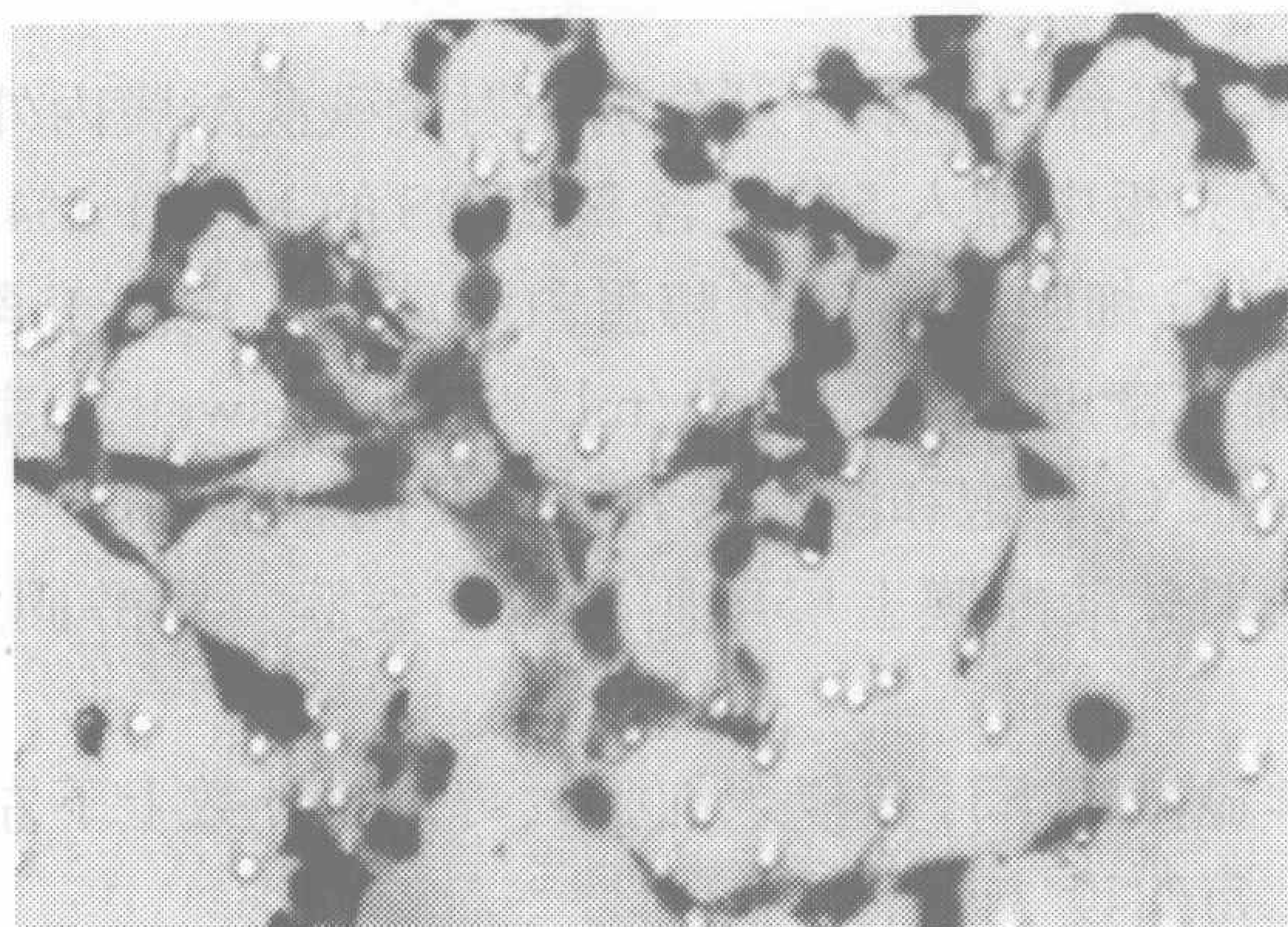


图 4-17　PG 细胞侵袭重建基底膜实验（Giemsa 染色，200×）
图中白亮小点为聚碳酸酯滤膜上的小孔

（2）在将 Transwell 小室放入 24 孔培养板时，要注意避免在聚碳酸酯膜下方形成气泡。

（3）在用棉签去除聚碳酸膜上层细胞时，动作要轻柔，以免聚碳酸酯膜变形而导致黏附在膜下层的细胞脱落。

（4）在封片时，载玻片及盖玻片在酒精灯上烧烤去除水汽后需待温度降下来再用树胶封片，以免温度过高造成聚碳酸酯膜变形。

（朱庆均）

4.6.3　肿瘤细胞迁移实验

【实验原理】

具有较高转移潜能的肿瘤细胞比起不转移肿瘤细胞具有更强的运动能力。肿瘤细胞在趋化因子作用下，形成伪足样突起，继而瘤细胞发生随意运动和定向运动。肿瘤细胞迁移实验也是利用 Transwell 小室进行，可以选择 8μm 或 12μm 孔径聚碳酸酯膜。通过计数穿过滤膜的细胞数可以在体外检测肿瘤细胞的迁移能力以及药物对肿瘤细胞迁移能力的影响。

【实验用品】

（1）器材：超净工作台、CO_2 培养箱、带 Transwell 小室的 24 孔板（8μm 或 12μm 孔径滤膜，Corning 公司产品）、棉签、载玻片、盖玻片及酒精灯。

（2）试剂与药品：RPMI 1640 培养液、胎牛血清（FBS）、FN（用无菌去离子水配制）、牛血清白蛋白（BSA）、胰蛋白酶、Giemsa 染液、中性树胶。

（3）材料：人高转移肺癌细胞株 PG 及小鼠成纤维细胞株 NIH3T3。

【方法与步骤】

方法 1

（1）人高转移肺癌细胞 PG 细胞在含 10%FBS 的 RPMI 1640 中常规培养。

（2）在聚碳酸酯滤膜外表面涂 40μl 的 FN（125μg/ml）作为趋化因子，在超净工

作台内干燥过夜。

(3) 使用前在超净工作台内用紫外灯分别照射聚碳酸酯膜内外表面 30min。

(4) 在 24 孔细胞培养板中加入 500μl 含 5%FBS 的 RPMI 1640 培养液。

(5) 取对数生长期 PG 细胞用 0.25%胰蛋白酶消化，重悬于含 0.1%BSA 的 RPMI 1640 培养液中，调整细胞密度至 2×10^5个/ml，在 Transwell 小室中每室加入 100μl 细胞悬液，置于 37℃、5%CO_2、饱和湿度培养箱中共同孵育 8h。

(6) 棉签轻轻擦去聚碳酸酯膜上层细胞后取下滤膜，甲醇固定 10min，Giemsa 染色，中性树胶封片。

(7) 于 200 倍光学显微镜下计数侵袭细胞数，每膜计数上下左右中 5 个视野的穿透细胞数，计算平均值，每组设 3 个平行孔。

方法 2

(1) 小鼠成纤维细胞株 NIT3T3 在含 10%FBS 的 RPMI 1640 中常规培养至对数生长期，用 0.25%胰蛋白酶消化收集细胞，调整细胞密度为 4×10^5个/ml，在无血清 RPMI 1640 培养液中培养 24h，收集培养液作为条件培养基，分装冻存备用。

(2) 人高转移肺癌细胞 PG 细胞在含 10%FBS 的 RPMI 1640 中常规培养。

(3) 在 24 孔细胞培养板中加入 500μl NIH3T3 条件培养基。

(4) 取对数生长期 PG 细胞用 0.25%胰蛋白酶消化，重悬于无血清 RPMI 1640 培养液中，调整细胞密度至 2×10^5个/ml，在 Transwell 小室中每室入 100μl 细胞悬液，置于 37℃、5%CO_2、饱和湿度培养箱中共同孵育 8h。

(5) 棉签轻轻擦去聚碳酸酯膜上层细胞后取下滤膜，甲醇固定 10min，Giemsa 染色，中性树胶封片。

(6) 于 200 倍光学显微镜下计数侵袭细胞数，每张膜计数上下左右中 5 个视野的穿透细胞数，计算平均值，每组设 3 个平行孔。

【结果与观察】

具有迁移能力的肿瘤细胞穿过聚碳酸酯滤膜微孔，黏附在聚碳酸酯膜下表面。用 Giemsa 染色可以在显微镜下观察计数穿过滤膜微孔的细胞数。

如果检测药物抗肿瘤迁移的能力，可以用下式计算：

抑制率=(阴性对照组平均迁移细胞数－实验药物组平均迁移细胞数)/阴性对照组平均迁移细胞数×100%。

【注意事项】

(1) 不同的肿瘤细胞迁移能力不同，其穿膜时间也有差别，对不同的肿瘤细胞需通过预实验确定出最佳的接种细胞密度及孵育时间。

(2) 在将 Transwell 小室放入 24 孔培养板时，要注意避免在聚碳酸酯膜下方形成气泡。

(3) 在用棉签去除聚碳酸膜上层细胞时，动作要轻柔，以免聚碳酸酯膜变形而导致黏附在膜下层的细胞脱落。

(4) 在封片时，载玻片及盖玻片在酒精灯上烧烤去除水汽后需待温度降下来再用树胶封片，以免温度过高造成聚碳酸酯膜变形。

（朱庆均）

4.7　哺乳动物正常组织细胞的体外培养与应用

哺乳动物体内有 200 多种细胞，绝大多数动物体内的细胞在体外原代培养时，能够表现出原来组织细胞的特性，是进行各种实验的理想材料。由于不同组织细胞的结构、功能和生长特性不同，在体外培养所需要的条件也不相同，本节将介绍几种常用的组织细胞体外培养方法和应用。

4.7.1　胎鼠大脑皮层神经细胞的原代培养方法

大脑皮层神经细胞（neural cell）起源于脑室的生发层，由神经祖细胞经过分裂、增殖和分化发育而成。神经细胞包括神经元（neuron）或称神经元细胞（neuronal cell）和神经胶质细胞（neuroglial cell）两大类，因此神经细胞培养包括神经元的体外培养和神经胶质细胞的体外培养。神经元是神经组织功能活动的主体，利用体外培养成活的神经细胞进行神经元结构和功能的研究，是当前神经生物学研究的重要手段之一。

本节将重点介绍胎鼠大脑皮层神经元的体外原代培养方法。

【实验原理】

由于神经元发育成熟后不再分裂，因此神经元体外培养只能进行原代培养。细胞最佳来源是受孕 14～18 天的胎鼠大脑皮层，神经元的纯度高，分化程度低，有较强的活性；其次是新生乳鼠，其大脑发育比较成熟，神经元分化程度较高，但神经胶质细胞较胚胎期比例升高。神经元对体外生存环境有一些独特的要求：①需要提供生长基质以促进神经元的贴壁，常用的基质包括多聚赖氨酸、多聚鸟氨酸、纤连蛋白和层粘连蛋白等，其中最常用的是多聚赖氨酸；②培养环境中需要维持较高浓度的 L-谷氨酰胺；③在培养过程中还需要注意控制胶质细胞的快速生长。本实验以孕 17～18 天胎鼠为例，介绍神经细胞培养方法。

【实验用品】

1. 器材

超净工作台、CO_2恒温培养箱、离心机、电热恒温干燥箱、高压灭菌锅、显微解剖镜、倒置相差（荧光）显微镜、显微镊、眼科剪、眼科镊、24 孔培养板、无菌服、口罩、帽子等。

2. 试剂

DMEM 高糖培养基、0.125%胰蛋白酶溶液（pH7.2～7.4）、无血清 DMEM 洗涤液、PBS 液、7.4%$NaHCO_3$溶液、0.1mg/ml 多聚赖氨酸、HEPES，以及胎牛血清。

（1）神经细胞培养液（1L）：

DMEM	900ml
胎牛血清	100ml
HEPES	4.76g

L-谷氨酰胺　　100mg

硫酸庆大霉素　　10 万单位

$NaHCO_3$调 pH 至 7.0，0.22μm 无菌滤器除菌，分装后 4℃保存备用。

（2）0.125%胰蛋白酶消化液：胰蛋白酶干粉 0.25g 溶于 200ml 无钙镁离子的 D-Hank's溶液中，4℃冰箱内放置 4h，轻轻搅拌数次，待其充分溶解后用 0.22μm 无菌滤器过滤除菌，分装后－20℃保存备用。

（3）7.4%$NaHCO_3$溶液：$NaHCO_3$ 7.4g 溶于 100ml 三蒸水中，充分溶解后过滤除菌，4℃保存。

（4）1mg/ml 多聚赖氨酸：多聚赖氨酸 10mg 溶于 10ml 三蒸水中，过滤除菌，分装后－20℃保存。使用时无菌三蒸水稀释 10 倍使用（0.1mg/ml），4℃保存。

3. 材料

孕 17～18 天胎鼠或新生乳鼠。

【方法与步骤】

1. 培养基质的准备

在无菌条件下取出待用的 24 孔培养板，每孔加入 200μl 的 0.1mg/ml 多聚赖氨酸，使多聚赖氨酸覆盖培养面，室温静置 5min 后，吸除多聚赖氨酸，将培养板敞口放置，待其自然晾干（约 20min）后，每孔加入 400～600μl 的无菌三蒸水覆盖培养面，室温静置 10min，弃三蒸水，晾干后将培养板加盖放置在超净工作台内备用。

2. 取材

取孕 17～18 天孕鼠，颈椎脱臼处死，75%乙醇消毒皮毛，迅速携入超净工作台内，剪开腹腔，取出子宫放入无菌大培养皿中，取出胚胎置于另一皿中，用无血清 DMEM 洗涤液清洗表面血污，后用眼科镊去除皮肤，暴露出两个大脑半球，用弯头眼科镊将脑组织轻轻夹起放入另一无菌培养皿中，用无血清 DMEM 洗涤液清洗血污，将脑组织移入解剖显微镜下仔细剥离去除脑膜，取其大脑皮层组织。

3. 酶消化法分散细胞

把大脑皮层组织移入离心管或者青霉素小瓶中，加入 10 倍体积 0.125%胰蛋白酶溶液，置于 37℃培养箱中消化 15～20min，其间轻轻震荡几次，使消化充分，待组织块变得疏松，有透明感时取出，在超净工作台内用吸管轻轻吸去消化液，加入 2～3ml 10%血清培养液，静置 2min 以终止消化，轻轻吸去培养液，再加 5～6ml 10%血清培养液用吸管反复吹打，使大部分组织块分散成细胞团或者单个细胞，静置片刻，让未被消化完的组织自然下沉。

4. 离心和计数

将上层细胞悬液移入离心管中，1000r/min 离心 8min，弃上清，培养液重悬细胞，血球计数板计数细胞密度，调整细胞密度至 4×10^5 个/ml。

5. 接种和培养

24孔板的每孔内接种1ml细胞悬液。轻轻混匀后盖上培养板盖，标上细胞名称、组号和接种日期等，置37℃、5%CO_2培养箱中培养。

【结果与观察】

接种后次日可取培养细胞做常规观察。在倒置相差显微镜下观察细胞贴壁和生长情况，并拍照记录（图4-18）。

细胞刚接种时，细胞呈圆形，悬浮均匀地分散在培养液中。接种后2～4h细胞开始贴壁，由圆形延展为短梭状（图4-18a）；培养24h时，多数神经细胞呈纺锤形，少数为三角形，胞体饱满，立体感强，部分细胞间的突起开始建立联系；培养48h，细胞之间建立起广泛的网络式联系（图4-18b）；可以用免疫荧光细胞化学方法鉴定神经元的纯度，图4-18c显示绿色荧光的细胞为MAP2抗体标记的神经元。

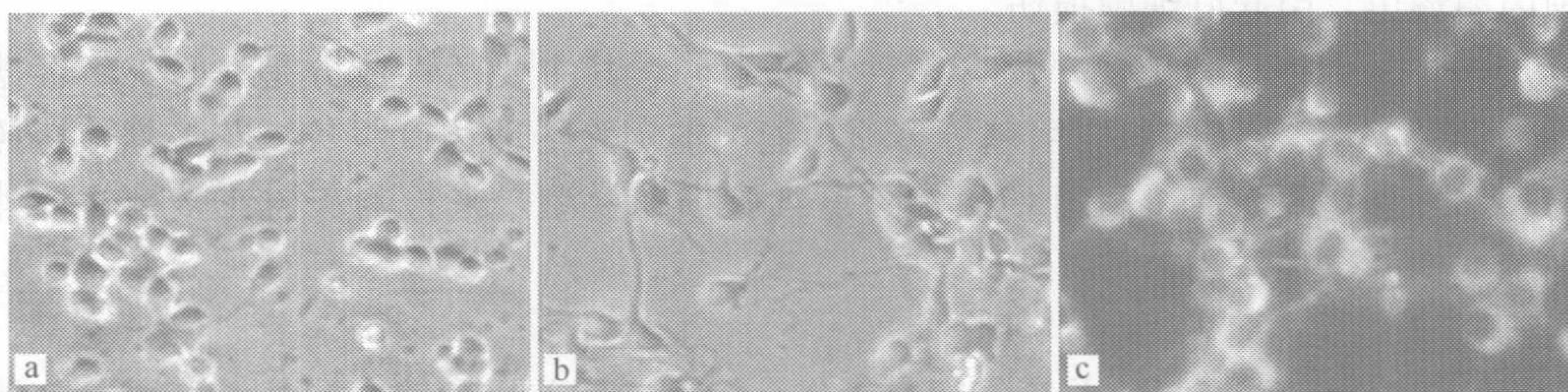


图4-18　体外原代培养的胎鼠大脑皮层神经细胞

a. 神经细胞接种培养4h；b. 神经细胞培养48h；c. MAP2抗体标记的神经元

【注意事项】

(1) 操作全过程要严格无菌。

(2) 培养基质的提前准备过程要严格进行，对细胞贴壁生长是不可缺少的一步。同时，由于多聚赖氨酸本身对细胞有一定毒性，因此，铺板所使用的多聚赖氨酸浓度不宜过高，普遍采用0.1mg/ml，且铺板的多聚赖氨酸自然干燥后要用无菌三蒸水洗涤基质表面，以减少多聚赖氨酸的细胞毒性。

(3) 操作过程要尽量迅速，确保取材组织来源的新鲜。

(4) 消化过程时间要严格，太长则细胞会因消化过度而死亡，太短会因消化不充分而得不到理想的单细胞悬液。

(5) 从CO_2培养箱中取出细胞进行观察时，观察时间不宜过长，以免培养液变碱性或温度变化对细胞造成的影响。

（逯素梅）

4.7.2　含药血清对体外培养细胞的药理实验

在中药药理学研究中，有相当一部分药理活性实验和作用机制是在体外进行的。由于中药成分复杂，进入体内后经过代谢和转化，药效会发生变化，因此利用中药粗提物直接进行体外实验，其结果的真实性和可靠性都受到很大影响。中药血清药理学方法比

较好地解决了这一问题。

“血清药理学”的概念是日本学者在1987年首先提出来的，指在动物经口服给药一段时间后采血分离血清，再用此含药血清进行体外药理实验的一种实验方法，它为科学地阐明中药复方的作用及其机制提供了重要的研究方法。

含药血清是依据药物在体内代谢的半衰期和达峰时间规律获得的，比较接近药物在体内环境中产生药理效应的真实过程，有助于中药复方化学成分研究及中药药动学研究的深入。本节将以灰树花多糖含药血清对肝细胞损伤保护作用实验为例，介绍其含药血清的体外实验方法。

【实验原理】

四氯化碳（CCl_4）是经典的肝损伤造模药物，CCl_4在肝细胞内经细胞色素P450激活，生成三氯甲基自由基和三氯甲基过氧自由基，攻击肝细胞膜上的磷脂分子并与膜脂和蛋白质分子共价结合，破坏膜结构和功能的完整性，使钙离子内流增加，最终导致肝细胞内酶渗出，引起肝细胞损伤。

灰树花是一种菌类植物，内含多种多糖组分，其主要活性成分是β-1,3-葡聚糖和β-1,6-葡聚糖，具有清除氧自由基等多项功能。本实验给动物口服灰树花多糖，按照血清药理学方法提取血清，利用CCl_4体外肝细胞损伤模型，来检测灰树花多糖在体外对肝细胞损伤的保护作用。

【实验用品】

（1）器材：CO_2恒温培养箱、超净工作台、倒置相差显微镜、Multiskan MK3酶标仪、25ml培养瓶、96孔板、微量加样器等细胞培养用品。

（2）试剂及配方：灰树花多糖、DMSO、CCl_4、MTT（5mg/ml）、胰蛋白酶、RPMI 1640培养基。

细胞培养液配制：含10%新生牛血清的RPMI 1640，庆大霉素100IU/ml，7.4% $NaHCO_3$调pH为7.0。

（3）材料：人正常肝细胞株（LO_2）；Wistar雌、雄性大鼠（体重200g±10g）。

【方法与步骤】

1. 大鼠含药血清制备

Wistar大鼠共36只，饲养一周适应环境，实验前称重，随机分组（每组各6只，雌雄各半），分为灰树花多糖灌胃组［设4个浓度：75mg/(kg·d)、150mg/(kg·d)、300mg/(kg·d)、600mg/(kg·d)灌胃］和空白对照组（灌胃三蒸水）。每天均灌胃2次，每次为半天量，连续9天，灌胃体积为1ml，正常饮食，第10天晚上禁食不禁水，次日早上一次性灌胃一天量，灌胃后1～2h内，心脏取血，4℃冰箱放置过夜，3000r/min，离心15min，小心分离出上层血清，经56℃、30min灭活处理后，用0.22μm孔径的无菌滤器除菌，分装于−20℃冰箱中保存备用。

2. CCl_4损伤液制备

将DMSO与CCl_4以物质的量比1∶2混合，震荡后加入RPMI 1640培养液中（终浓度为0.1μmol/μl），得到结晶细小的CCl_4溶液，4℃冰箱保存备用。

3. 细胞培养

常规培养人正常肝 LO_2 细胞，取对数生长期细胞传代。实验前将肝 LO_2 细胞以密度为 3×10^4 个/ml 接种在 96 孔板中，每孔 100μl，于 37℃、5%CO_2 饱和湿度条件下静置培养。24h 后进行分组实验。

4. 分组实验

细胞分为四组：空白组、正常组、CCl_4 损伤组和含药血清保护组，每组设 6 个复孔。空白组每孔只加入 100μl 培养液，不接种细胞。

（1）加含药血清：细胞接种 24h 后，空白组、正常组和 CCl_4 损伤组每孔中加入灌胃蒸馏水的大鼠血清；含药血清保护组分别加入 4 个不同浓度的含药血清，加入血清的终浓度为 5%，即 96 孔板中，每孔加入 5μl 血清。

（2）CCl_4 损伤：加入血清 12h 后，CCl_4 损伤组和含药血清保护组每孔加入 6μl 浓度为 0.1μmol/μl 的 CCl_4 损伤液，即 CCl_4 终浓度 6μmol/ml。

（3）MTT 检测细胞存活率方法：加入 CCl_4 损伤 2h 后每孔均加入 5mg/ml 的 MTT20μl，放入 CO_2 培养箱继续培养，4h 后取出培养板，吸净培养液后加入 100μl 二甲基亚砜（DMSO），培养箱继续孵育 20min，振荡待颗粒全部溶解后，用全自动酶联仪测定每孔的吸光度（OD 值）（测试波长 570nm，参考波长 630nm）。以下式计算试验组细胞的相对存活率：细胞相对存活率＝$(OD_{实验}-OD_{空白})/(OD_{对照}-OD_{空白})\times100\%$。

【结果与分析】

1. 细胞形态学活体观察

图 4-19 为 CCl_4 损伤 2h 后在倒置相差显微镜下拍摄的细胞。其中 a 为正常组肝细胞 LO_2，细胞呈不规则的多边形，核圆形，细胞轮廓清晰，立体感强；b 为 CCl_4 损伤组细胞，大部分细胞呈凋亡状态：细胞表面凹凸不平，细胞核边集变形，有凋亡小体的形成，部分凋亡小体可从细胞上脱落；c 为 300mg/(kg·d) 灌胃灰树花含药血清保护组细胞，与正常组细胞形态接近，少见凋亡细胞。

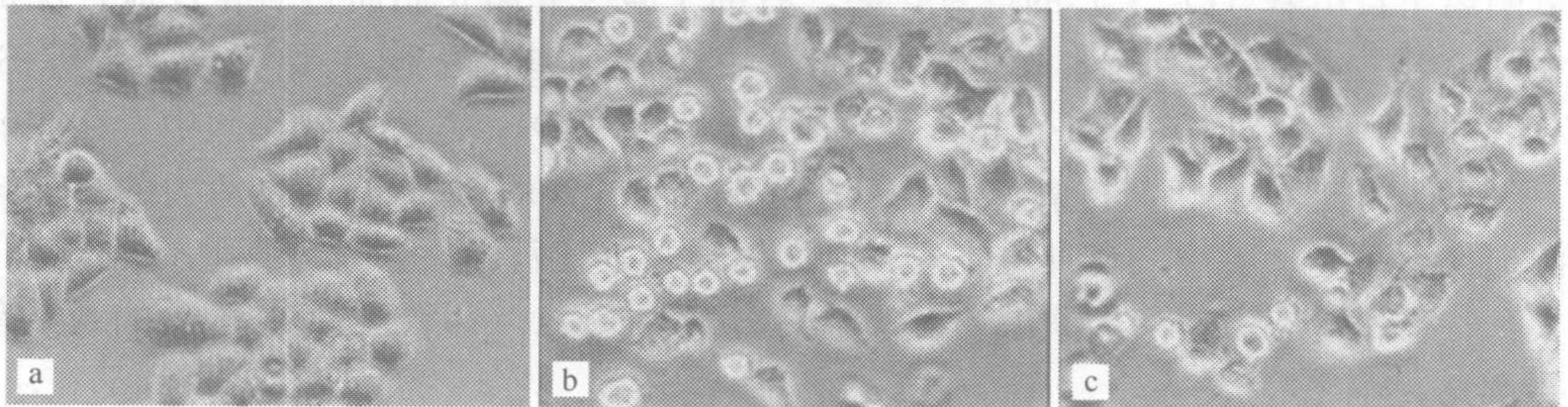


图 4-19　灰树花多糖含药血清对肝细胞损伤保护作用

a. 正常组细胞；b. CCl_4 损伤组；c. 300mg/(kg·d) 灰树花含药血清保护组

2. MTT 法测细胞存活率分析

数据处理后计算机制图（图 4-20）。

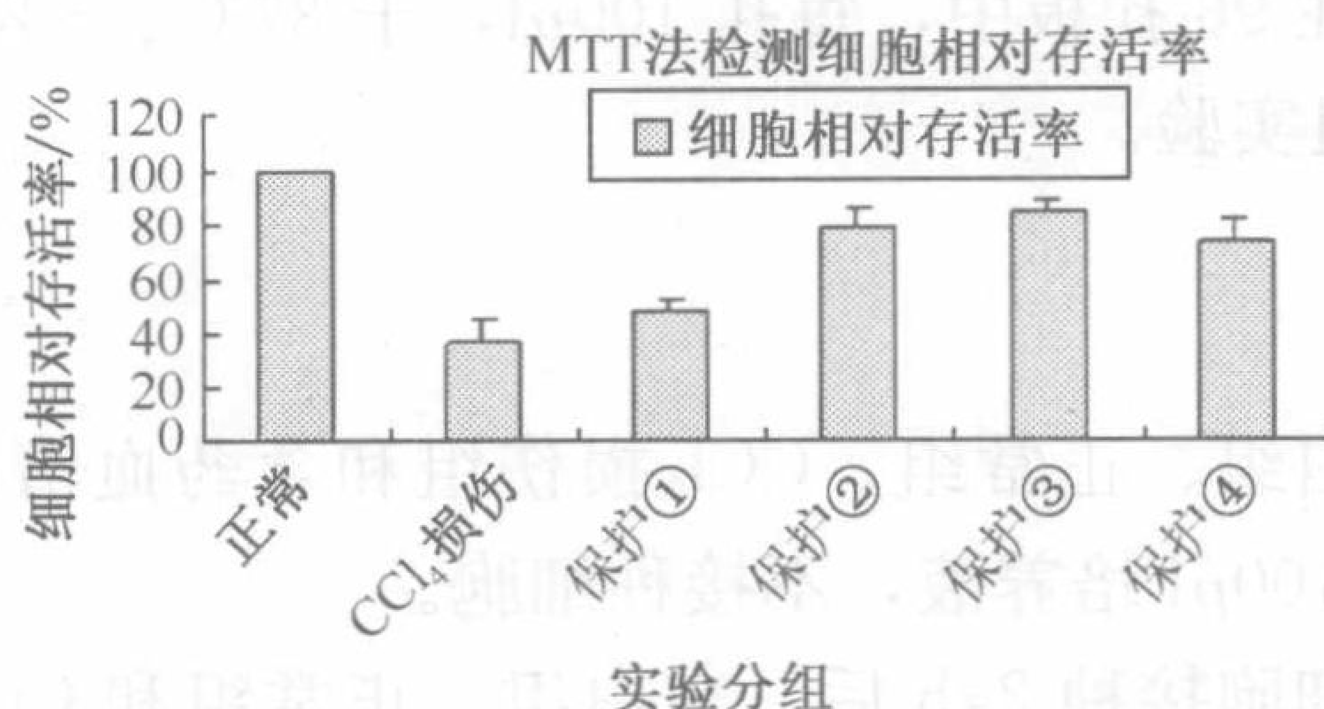


图 4-20　MTT 法检测细胞存活率直方图

显示不同浓度的灰树花多糖含药血清对 CCl_4 肝细胞损伤的保护作用，其中以 300mg/(kg · d) 的灌胃组含药血清保护作用最明显。保护①、②、③、④分别为 75mg/(kg · d)、150mg/(kg · d)、300mg/(kg · d)、600mg/(kg · d) 灌胃的灰树花多糖含药血清保护

【注意事项】

（1）选择含药血清的灌胃量，要比动物实验的灌胃量大，因为加入含药血清时，只加入了总体积的 5%，血清的浓度被稀释了，一般按给药剂量＝动物实验的给药剂量×反应体系中被稀释的倍数计算灌胃量。

（2）另外含药血清制备时，不同的药物，末次灌胃后取血时间要根据药物的血药浓度达峰时间决定，大部分中药是末次灌胃后 1～2h 达峰浓度，但如果有具体的达峰时间，在药物达峰浓度时取血最好。

（刘鲁华）

4.7.3　四氯化碳致肝细胞损伤及 SOD 活性检测

超氧化物歧化酶（SOD）是 1969 年 Fridovich 和 McCord 从牛红细胞中发现并正式命名的，它是广泛存在于生物体内的各个组织中的重要金属酶，是唯一能够特异性清除超氧阴离子自由基（O_2^- ·）的抗氧化酶，有助于减少和阻止脂质过氧化反应，保护细胞免受氧化损伤，延缓机体衰老。按 SOD 中金属辅基的不同主要可分为铜锌-SOD（CuZn-SOD）、锰-SOD（Mn-SOD）和铁-SOD（Fe-SOD），高等动物细胞中只存在前两种。SOD 对机体的氧化与抗氧化水平起着至关重要的作用，因而 SOD 活力的高低与肝脏的损伤、衰老、肿瘤、自身免疫病、血液病、心血管病、肾脏病、消化系统疾病、辐射、药物作用等有着密切的联系，对疾病的病因学探讨、诊断、治疗、术后的观察有着重要意义。

【实验原理】

天然 SOD 的催化活性非常强，哺乳动物 CuZn-SOD 的催化速度可达到 2×10^9 L/(mol · S)。SOD 的作用机制如下：$O_2^- \cdot + HO_2^- \cdot + H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ 产生的过氧化氢由过氧化氢酶进一步清除。

通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子（O_2^- ·），后者氧化羟胺形

成亚硝酸盐，在显色剂的作用下呈现紫红色，用可见分光光度计测定其吸收度。当被测样品中含SOD时，则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用，使形成的亚硝酸盐减少，比色时测定管的吸光度值低于对照管的吸光度值，通过公式计算可求出被测样品中的SOD活力。本节将以四氯化碳（CCl_4）致肝细胞氧化性损伤为例，介绍SOD活性检测方法。

【实验用品】

（1）器材：细胞培养常规仪器和用品，倒置相差显微镜，可见分光光度计，37℃恒温水浴锅，低温高速台式离心机，微量式移液器，加样枪头。

（2）试剂：四氯化碳（CCl_4）、DMSO、小牛血清、RPMI 1640培养液、冰乙酸（分析纯）、蒸馏水、SOD测定试剂盒、细胞裂解液（50mmol/L Tris · Cl pH8.0，150mmol/L NaCl，0.02%叠氮钠，0.1%SDS，100μg/ml aprotinin，1%NP-40）。

（3）材料：肝HepG2细胞株。

【方法与步骤】

1. 损伤细胞的制备

（1）细胞培养：HepG2细胞以5×10^4个/ml密度接种于25cm^{2}培养瓶中，待细胞铺满瓶底80%以上，进行细胞损伤。

（2）CCl_4损伤液制备：将DMSO与CCl_4 1∶2混合，震荡后加入RPMI 1640培养液中（终浓度为0.4μmol/μl），得到结晶细小的CCl_4溶液。

（3）CCl_4损伤细胞：在HepG2细胞对数生长期加入CCl_4损伤液（终浓度为6μmol/ml），3h后观察收集细胞。

2. 制备细胞裂解液

（1）用细胞刮刮下培养瓶中的细胞转移至预冷的微量离心管中，用PBS洗涤2次后，视细胞沉淀量加入适量裂解缓冲液冰浴30min。

（2）离心10min，12 000r/min，转移上清至新的微量离心管中。

3. BCA法测定蛋白浓度

（1）完全溶解蛋白标准品，取6支离心管分别编号0～5，分别加入标准蛋白BSA液0μl、20μl、40μl、60μl、80μl、100μl，不足100μl用蒸馏水补足至100μl。

（2）按50∶1的比例混合试剂盒中的试剂A和试剂B，得到混合工作试剂。

（3）在上述配好的标准管中分别加入混合工作试剂1ml。

（4）测定样品的准备：取样品2μl，并用蒸馏水补足至10μl，加入混合工作液100μl。

（5）样品管和标准管均置于37℃保温30min。

（6）浓度测定：首先用紫外可见分光光度计测定标准品在562nm波长的吸光度，以标准品的浓度一吸光度做标准曲线。

（7）测定样品的吸光度，根据标准曲线计算出样品中的蛋白浓度。样品分装保存于－70℃。

4. SOD 酶活力的测定

按表 4-3 操作，测定酶活力。

表 4-3　SOD 酶活力测定操作表

试剂	测定管	对照管
试剂一/ml	1.0	1.0
样品/ml	a	
蒸馏水/ml		a
试剂二/ml	0.1	0.1
试剂三/ml	0.1	0.1
试剂四/ml	0.1	0.1
用漩涡混匀器充分混匀，置 37℃恒温水浴 40min		
显色剂/ml	2	2
混匀，室温放置 10min，于波长 550nm 处，1cm 光径比色杯，蒸馏水调零，比色		

【结果与观察】

（1）倒置相差显微镜观察细胞，正常人肝癌 HepG2 细胞在对数生长期，细胞呈梭形或者不规则的多边形，核圆形，约占细胞直径的 1/2 左右，细胞轮廓清晰；凋亡细胞表面凹凸不平，有凋亡小体形成，部分凋亡小体可从细胞上脱落。

（2）计算：每毫升反应液抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位（U）。

$$\text{SOD活力}(\text{U/ml})=\frac{\text{对照管吸光度}-\text{测定管吸光度}}{\text{对照管吸光度}\times 50\%}\times\text{反应体系的稀释倍数}\times\text{样本测试前的稀释倍数}$$

【注意事项】

（1）试管及枪头要洗干净，最好经过消毒。

（2）样品试剂放至室温再用，至少 30min。

（3）为避免测试误差，第一次吸的试剂要丢弃（用作冲洗管道之用），吸嘴外周若挂有液体要用滤纸轻轻擦干，样品和试剂要垂直加入试管，不要加在管壁上（因试剂及样品量少）。水浴前要用漩涡混匀器充分混匀。

（4）每次水浴时间为 40min，当室温低于 20℃时水浴时间可延长至 45min，水浴温度 37℃要固定。

（5）细胞内的 SOD 活力测定，要换算成每毫克蛋白的酶活力，需要测定蛋白质的浓度。

（苑辉卿）

参考文献

陈瑞铭．1998．动物组织培养技术及其应用．北京：科学出版社．16～67

陈意生，史景泉．2004．肿瘤分子生物学．北京：人民军医出版社

鄂征．2004．组织培养技术及其在医学研究中的应用．北京：中国协和医科大学出版社．

弗雷谢尼 RI．2004．动物细胞培养-基本技术指南．第四版．章静波，徐存拴等译．北京：科学出版社．77～179

高进，章静波．2003．癌的侵袭与转移基础与临床．北京：科学出版社

韩锐. 1997. 抗癌药物研究与实验技术. 北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社

李小定，荣建华，吴谋成等. 2003. 灰树花多糖的抗肿瘤活性及对免疫功能的影响. 中药材，26 (1) ：31～32

李仪奎. 1999. 中药血清药理学实验方法的若干问题. 中药新药与临床药理，10(2)：95

罗学港，唐建华，熊燕. 2002. 神经科学基础. 湖南：中南大学出版社. 115～159

司徒镇强，吴军正. 2004. 细胞培养. 西安：世界图书出版社.

孙久荣. 2004. 神经解剖生理学. 北京：北京大学出版社. 16～33

辛华. 2001. 细胞生物学实验. 北京：科学出版社.

薛庆善. 2001. 体外培养的原理与技术. 21～157

杨彦芳，王玉芹. 2000. 中药复方血清药理学方法规范化探讨. 中国中西医结合杂志，20(5)：380～382

于荣利，张桂玲，秦旭升. 2005. 灰树花研究进展. 上海农业学报，21(3)：101～105

苑辉卿. 2007. 基础医学实验教学系列教材：医学细胞分子生物学实验. 北京：科学出版社. 159～161

章静波. 2002. 组织和细胞培养技术. 北京：人民卫生出版社.

张良，徐立. 2002. 中药血清药理学方法的研究进展. 南京中医药大学学报(自然科学版)，18(4)：254～256

张卓然. 2004. 培养细胞学与细胞培养技术. 上海：上海科学技术出版社.

郑志竑，林玲. 2002. 神经细胞培养理论与实践. 北京：科学出版社. 30～78

Shu-Zhen Zhang，Ben-Peng Yang，Cui-Lian Feng. 2005. Genetic Transformation of Tobacco with the Trehalose Synthase Gene from Grifola Fr. Enhances the Resistance to Drought and SALT. Journal of Integrative Plant Biology，47 (5)：579～587

第5章　培养细胞凋亡检测技术

在多细胞生物中，细胞死亡有两种不同的形式，即细胞坏死（necrosis）和细胞凋亡（apoptosis）。细胞坏死是指由外界因素，如局部缺血、高热、物理、化学和生物等因素而导致的细胞急速死亡。细胞坏死时膜通透性增高，细胞肿胀，溶酶体酶释放导致细胞溶解，常引起炎症反应。而细胞凋亡是细胞在生理或病理条件下由基因控制的死亡过程，也称程序性细胞死亡（programmed cell death，PCD）。在凋亡过程中膜结构始终保持良好的整合性，染色质浓缩边集，染色体DNA断裂、细胞膜包裹着核碎片或胞质形成凋亡小体（apoptotic body），在凋亡过程中由于溶酶体和质膜的结构保持完整，因此不引起炎症反应。

凋亡细胞内核酸内切酶的激活，可导致染色体DNA断裂成180bp或其整倍长度的DNA片断，在DNA琼脂糖凝胶电泳上会形成特征性的梯形电泳条带（DNA Ladder）。

根据细胞凋亡的形态学及分子生物学特征，可采用多种方法进行鉴定，目前常用的方法有：光学显微镜形态学观察、电子显微镜形态学观察、DNA琼脂糖凝胶电泳、MTT细胞活性检测、流式细胞仪分析、凋亡细胞的原位末端标记（TUNEL）、细胞膜磷脂酰丝氨酸（PS）荧光显示等。

本节将重点介绍研究细胞凋亡常用的几种方法：①光学显微镜形态学检测；②电子显微镜形态学观察；③凋亡细胞的MTT检测；④凋亡带的检测以及凋亡细胞原位末端标记等方法。流式细胞仪检测细胞凋亡的方法将在第12章中介绍。

5.1　光学显微镜形态学检测

形态学检测是鉴定细胞凋亡最可靠的方法，可以根据凋亡细胞的形态学特征通过光学显微镜的观察进行定性研究。例如，在倒置相差显微镜下观察生活状态下细胞凋亡的进程；在普通光学显微镜下观察HE染色、Giemsa染色、甲基绿-派洛宁染色和台盼蓝染色后凋亡细胞的染色质浓缩、边集现象和凋亡小体等；用荧光显微镜观察吖啶橙荧光染色以及用荧光探针PI和Ho.33342双标记细胞来分析细胞的凋亡。

【实验原理】

细胞凋亡的进程在形态学上可以分为三个阶段：①凋亡的起始，细胞表面特化结构，如微绒毛、细胞间接触消失。细胞核固缩，染色质形成新月形或块状凝集，内质网腔膨胀，并与质膜融合；②凋亡小体的形成，染色质断裂为大小不等的片段，与一些细胞器一起被反折的细胞膜包围，以出泡的方式形成凋亡小体；③凋亡小体被邻近的细胞吞噬清除。

选择体外培养生长状态良好的细胞，在培养液内加入凋亡诱导剂，细胞会按照特定程序发生凋亡。在显微镜下可以观察到处于各阶段的凋亡细胞。

【实验用品】

（1）仪器设备：倒置相差显微镜、普通光学显微镜、细胞培养常规设备。

（2）实验用品：25ml 培养瓶、24 孔板、离心管、吸管、移液管、胶塞、橡皮吸头、酒精灯、试管架、酒精棉球和微量加样器、加样头、细胞计数板、载玻片和盖玻片等。

（3）试剂：RPMI 1640 培养液（含 10％小牛血清、庆大霉素）、0.25％胰蛋白酶、7.4％ $NaHCO_3$、各类染液：2％台盼蓝染液、Ehrlich 苏木精-伊红染液、Giemsa 原液、吖啶橙荧光染液、Ho. 33342、PI 凋亡试剂盒和大蒜素等。

（4）实验材料：人肝癌 HepG2 细胞。

【方法与步骤】

1. 细胞培养与诱导凋亡

用 25ml 培养瓶体外培养人肝癌 HepG2 细胞，2～3d 传一代。在实验前一天将细胞以 2×10^4 个/ml 接种于预先放入盖玻片的 24 孔板中。在试验前 2～4 h 加入大蒜素（60 mg/L大蒜素），37℃、5％CO_2、饱和湿度条件下继续培养。

2. 倒置相差显微镜细胞形态学观察

取出长有细胞的盖玻片，在倒置相差显微镜下进行细胞形态学观察，并照相记录。

3. 选择不同方法进行细胞固定、细胞化学或荧光化学染色、封片，光学显微镜或荧光显微镜观察

【观察与结果】

倒置相差显微镜下细胞形态学观察（图 5-1）。

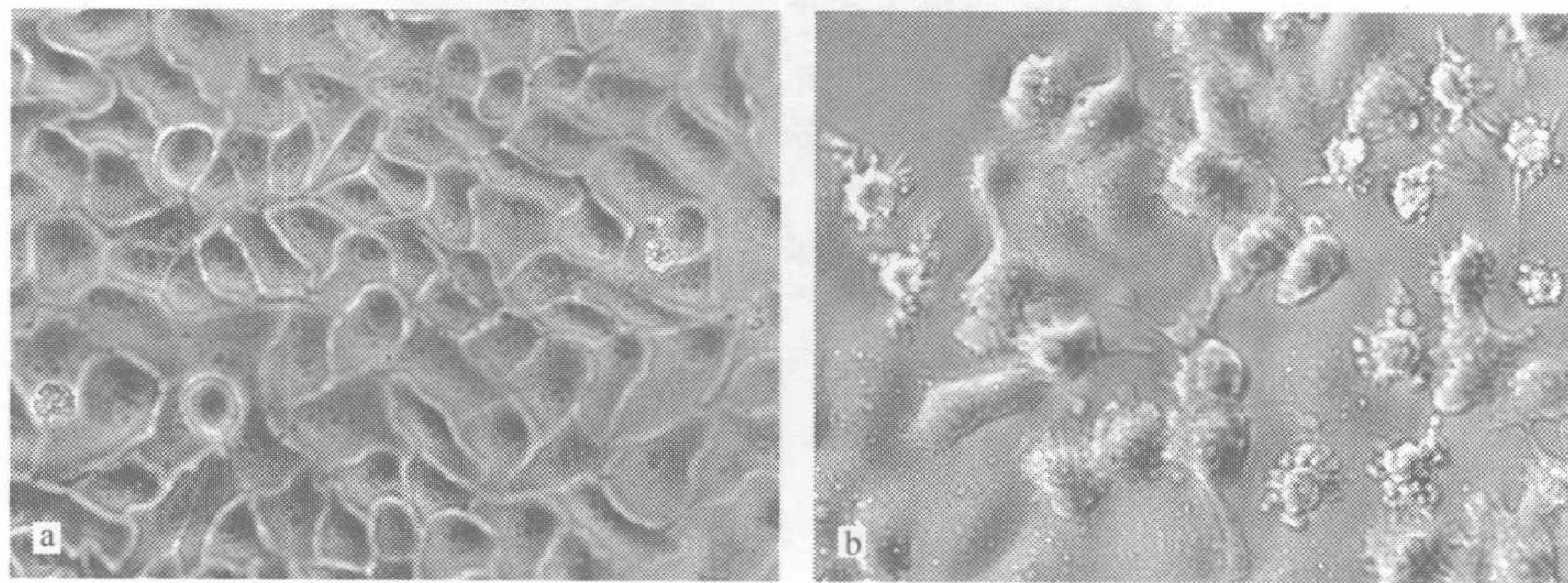


图 5-1　大蒜素诱导的人肝癌 HepG2 细胞凋亡（倒置相差显微镜活体观察）

a. 正常 HepG2 细胞；b. 大蒜素诱导的 HepG2 细胞凋亡

体外培养的正常人肝癌 HepG2 细胞为上皮形细胞，多边形，胞体丰满，核大而明显，可见多个核仁，细胞之间边界清晰，折光性好，如图 5-1a；加入 60 mg/L 大蒜素作用2～4 h，HepG2 细胞出现典型的细胞凋亡形态变化：细胞体积缩小，染色质浓聚边集、裂解，细胞表面凸起多个小泡，如图 5-1b 所示；后期凋亡细胞胞体消失，残留不规则的细胞碎片。

（辛华）

5.1.1　台盼蓝染色法显示凋亡细胞

【实验原理】

台盼蓝染料分子不能通透穿越活细胞膜进入细胞内，故细胞显示无色。坏死细胞由于细胞膜通透性改变，台盼蓝染料可以进入细胞内，因而细胞被染成蓝色。凋亡细胞由于细胞膜功能保持完整，故凋亡细胞对台盼蓝拒染而不显色。根据该原理可以区别正常细胞、坏死细胞与凋亡细胞。

【实验用品】

（1）器材与用品：普通光学显微镜、细胞培养常规设备和用品、载玻片和盖玻片。

（2）实验试剂：2%台盼蓝、细胞培养用液、0.25%胰蛋白酶。

（3）实验材料：人肝癌 BEL-7402 细胞悬液。

【方法与步骤】

（1）细胞悬液制备：用 0.25%胰蛋白酶将细胞从培养瓶中消化下来，加等量含血清培养液终止消化，移入离心管以 1000r/min 离心 5～10min，弃去上清液，加入少量培养液，用吸管轻轻吹打制成细胞悬液。

（2）台盼蓝染色：取 0.5ml 细胞悬液放入干净试管中，加入约 0.1ml（1～2 滴）2%台盼蓝染液混合，2min 后取 1 滴混合细胞悬液滴在干净载玻片上，加盖玻片后用高倍镜观察。

【观察与结果】

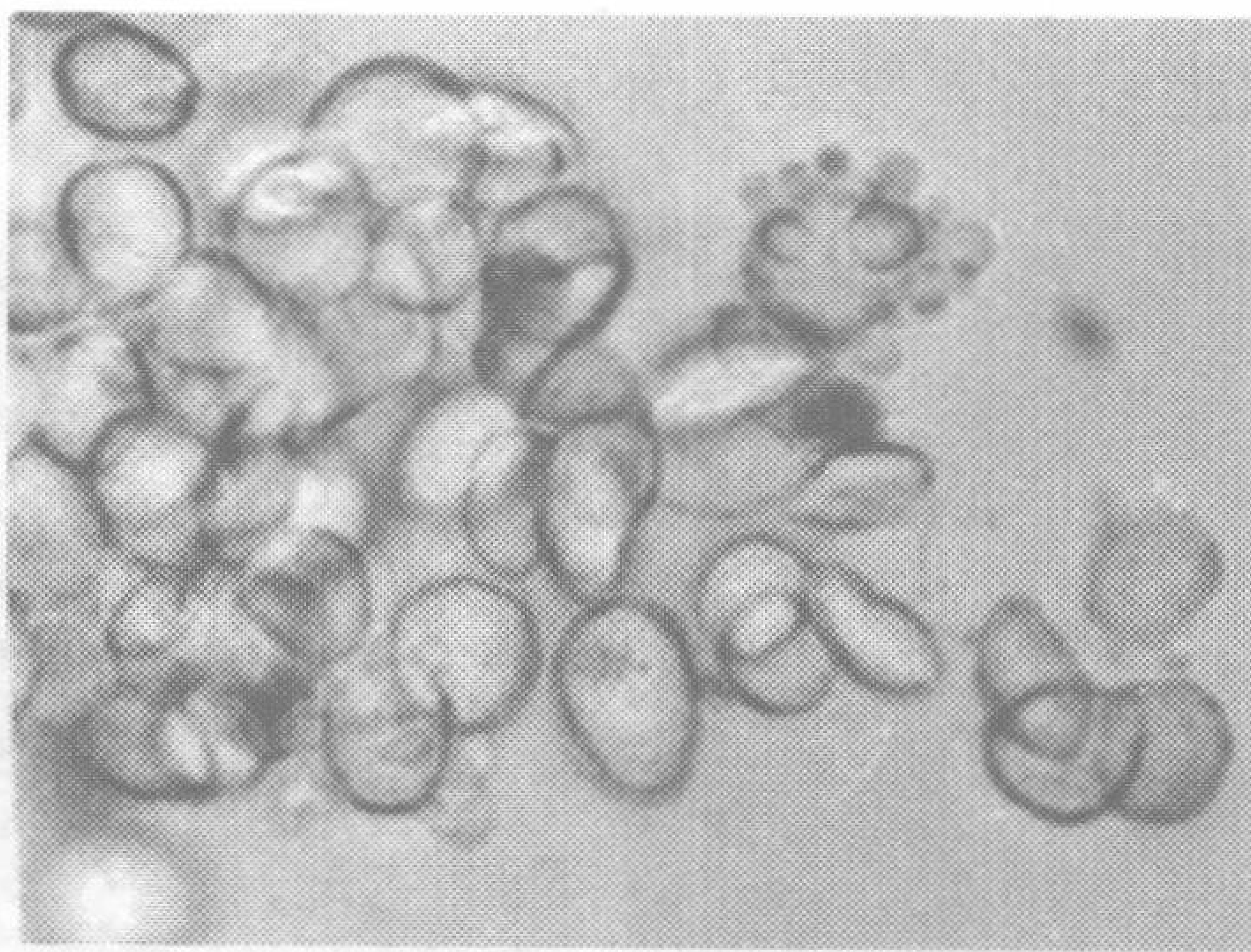


图 5-2　台盼蓝染色显示凋亡小体

人肝癌 BEL-7402 细胞为上皮形细胞，多边形，胞体丰满。用 0.25%胰蛋白酶从瓶中消化下来后，细胞变成圆形或椭圆形，经台盼蓝染色后，死细胞被染成蓝色，而活细胞和凋亡细胞以及凋亡小体不着色（图 5-2）。

（辛华）

5.1.2　苏木精-伊红染色（HE 染色）显示凋亡细胞

【实验原理】

苏木精-伊红染色简称 HE 染色，是一种双重染色法。其中苏木精是一种染细胞核

的碱性染料，与 DNA 双链中的磷酸分子结合呈蓝色；伊红是染细胞质的酸性染料，与蛋白质的氨基酸正电荷结合显示红色或粉红色，两者使核质间形成鲜明的对比，从而使凋亡细胞形态学特征很好地显示出来。

【实验用品】

（1）器材与用品：普通光学显微镜、细胞培养常规设备和用品、载玻片、盖玻片、滴管、小平皿。

（2）实验试剂：Ehrlich 苏木精染液、伊红染液、4％的甲醛、70％酸乙醇（100ml 70％乙醇中加 1ml 盐酸）、梯度酒精和二甲苯、中性树胶。

（3）材料：人肝癌 BEL-7402 细胞。

【方法与步骤】

（1）取出长有人肝癌 BEL-7402 细胞的盖玻片，PBS 轻轻漂洗 2 次；

（2）4％的甲醛或多聚甲醛常温下固定 5～10min；

（3）苏木精染液染色 15～30 min；

（4）自来水返蓝；

（5）分色：70％酸乙醇分色数秒至淡紫红色；

（6）自来水蓝化数 min；

（7）蒸馏水洗，经过 50％、70％、80％、90％梯度乙醇脱水各 1min；

（8）入伊红染液 1～3 min；

（9）入 100％乙醇 2 次，各 1 min ；

（10）二甲苯透明 1 min，中性树胶封片。

【观察与结果】

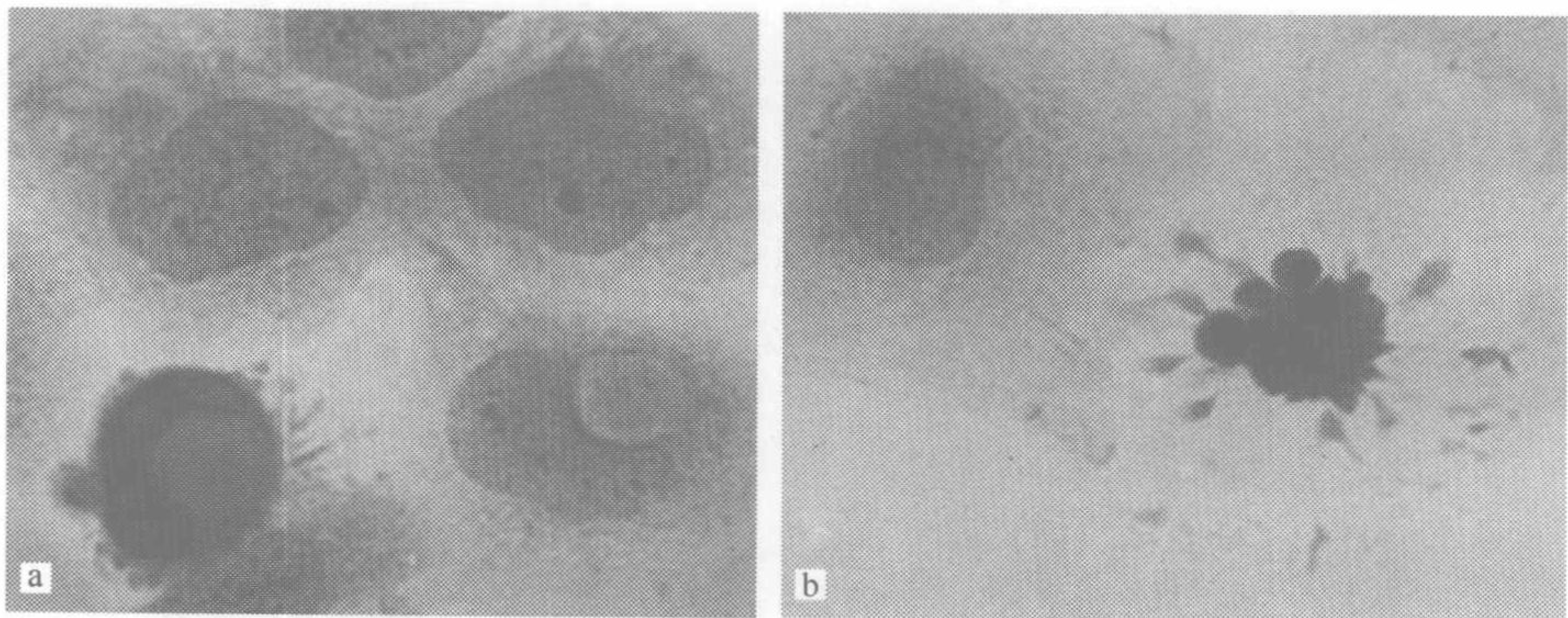


图 5-3 HE 染色显示凋亡细胞

a. 染色质新月形边集 ；b. 凋亡小体

高倍镜下观察 HE 染色标本，正常肝癌 BEL-7402 细胞核染成紫红色，圆形或椭圆形，细胞质淡染，呈粉红色，边界不明显。少数凋亡细胞核内发生边集的染色质呈深紫色。胞体周围凋亡小体着色深浅不一，深染者提示含有染色质断片。晚期的凋亡小体碎片不规则，淡染（图 5-3）。

（辛华）

5.1.3 Giemsa染色法显示凋亡细胞

【实验原理】

吉姆萨（Giemsa）基本成分是由天青、伊红组成，是一种复合染料，适用于多种细胞染色，尤其是显示细胞核和染色体。细胞凋亡时细胞核染色质边集浓缩，染色体DNA断裂碎片进入凋亡小体，因此可以很好地被显示。

【实验用品】

（1）器材：普通光学显微镜、载玻片、盖玻片、小平皿。

（2）试剂：Giemsa原液、pH7.0的PBS、Giemsa工作液（使用前取1ml Giemsa原液与4ml 1/15M的PBS混合，PBS配方见3.1.8）、甲醇。

（3）材料：人肝癌HepG2细胞或结肠癌SW480细胞。

【方法与步骤】

（1）取出盖玻片，PBS轻轻漂洗2次；

（2）充分干燥；

（3）甲醇固定5～10 min；

（4）空气干燥；

（5）Giemsa工作液染色10～20 min；

（6）流水冲洗；

（7）充分干燥；

（8）二甲苯透明2 min，中性树胶封片。

【观察与结果】

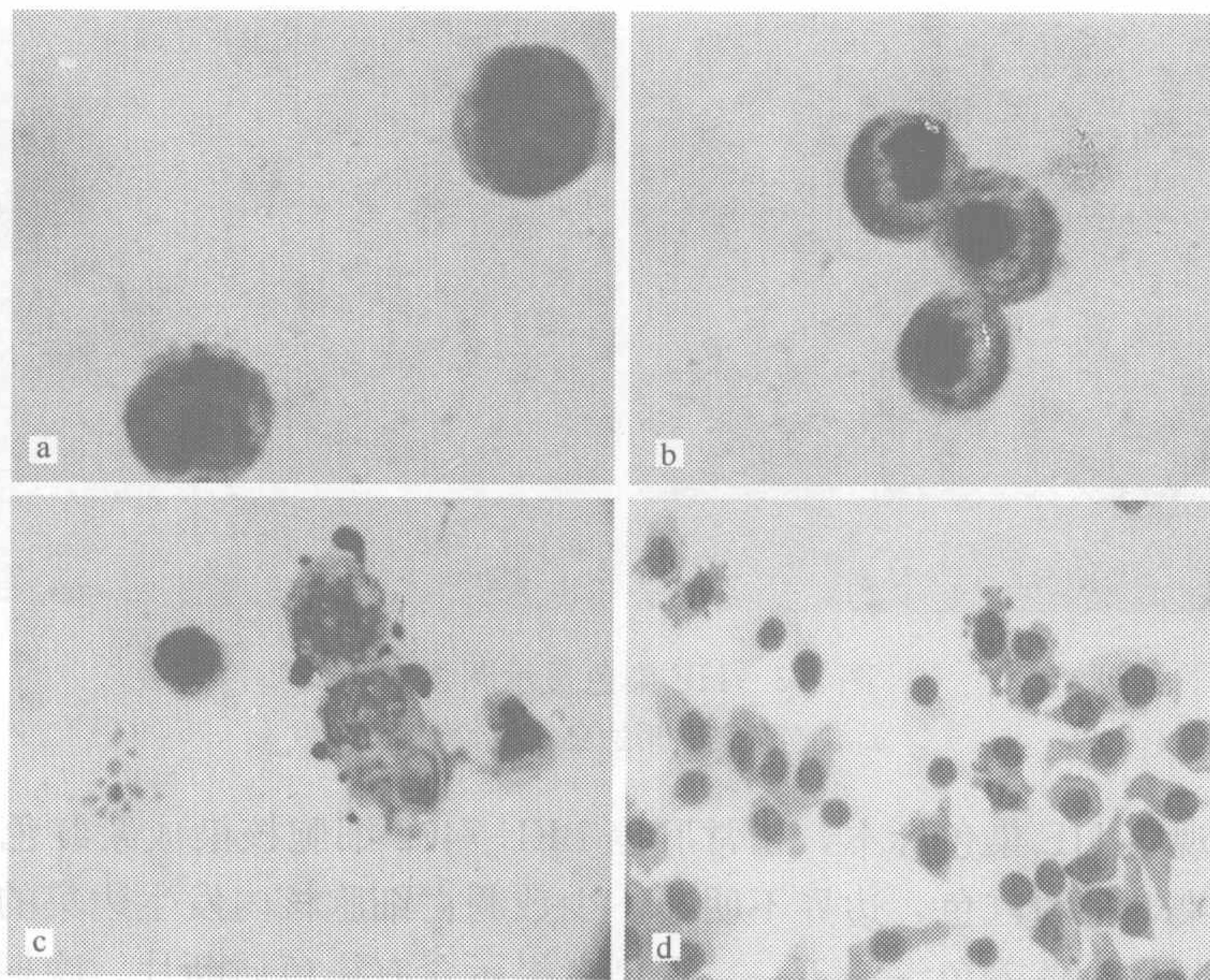


图5-4　Giemsa染色显示凋亡细胞

a. 正常SW480细胞；b. 染色质凝集聚集在细胞中央；c. 出现凋亡小体；
d. Giemsa染色显示人肝癌HepG2细胞凋亡小体

高倍镜下观察，正常结肠癌 SW480 细胞圆形或椭圆形，核大被染成蓝紫色或紫红色，细胞质淡染；凋亡细胞核内染色质凝集，呈深紫色；胞体周围凋亡小体着色深浅不一，深染者提示含有染色质断片，晚期的凋亡小体碎片不规则，淡染（图 5-4）。

人肝癌 HepG2 细胞核被染成蓝紫色，呈圆形或椭圆形，细胞质染成浅蓝色。细胞凋亡时，核浓缩边集，成新月形或不规则：细胞体积缩小，细胞表面凸起多个小泡。

（辛华）

5.1.4　吖啶橙荧光染色显示凋亡细胞

【实验原理】

由于吖啶橙（acridine orange，AO）与多聚体的 DNA 和 RNA 亲和力不同，可以同时显示细胞内的 DNA 和 RNA，使核 DNA 显示黄绿色荧光，细胞质和核仁显示橘红色荧光，因此可以很好地显示凋亡细胞的核和凋亡小体变化。

【实验用品】

（1）器材：荧光显微镜、载玻片、盖玻片、吸管、吸水纸。

（2）试剂：0.1%吖啶橙原液：0.1g 吖啶橙溶于 100ml 蒸馏水中，4℃避光保存。临用时配制成 0.01%的吖啶橙工作液，即取 1ml 原液加 9ml PBS 溶液（pH 7.0）。

（3）材料：人肝癌 HepG2 细胞。

【方法与步骤】

（1）取出盖玻片，PBS 轻轻漂洗 2 次；

（2）95%乙醇固定 10 min；

（3）充分干燥；

（4）滴加 0.01% 吖啶橙染液染 5 min；

（5）加盖玻片临时封固后荧光显微镜下（选用紫蓝光激发滤片）观察。

【观察与结果】

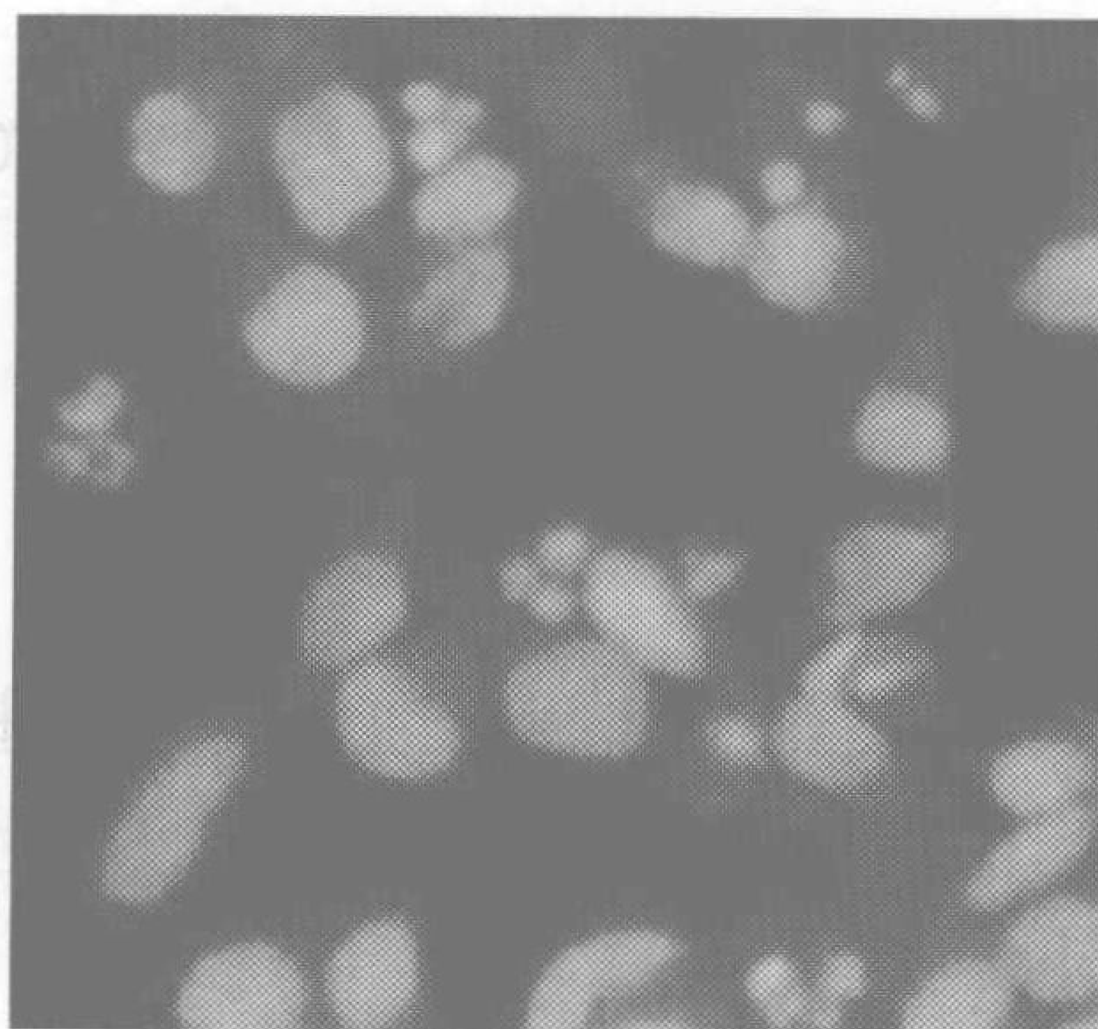


图 5-5　吖啶橙荧光染色显示凋亡细胞

荧光显微镜下，正常肝癌 HepG2 细胞核发黄绿色荧光，细胞质发橘红色荧光。凋亡细胞核内边集的染色质呈黄绿色，胞体周围含有染色质断片的凋亡小体呈绿色，无染

色质断片的凋亡小体呈橘红色（图5-5）。

（辛华）

5.1.5 Ho.33342与PI荧光双染显示凋亡与坏死细胞

【实验原理】

正常细胞和凋亡细胞都保持了膜的完整性，但凋亡细胞核染色质发生高度凝集和边缘化，并形成大小不同被膜包围的凋亡小体；而正常细胞核染色质均匀分布；坏死细胞膜损伤，染色质凝集程度远底于凋亡细胞。根据细胞膜功能完整性和核内染色质发生凝集的特点，用荧光探针碘化丙锭（PI）和Ho.33342双染方法可以区别凋亡细胞、坏死细胞和正常细胞。

PI是双链核酸的标记物，可嵌入双链DNA或双链RNA中，PI不能穿过功能完整细胞膜，只能进入膜有损伤的细胞。在紫外光或绿光激发后，坏死细胞呈现出很强的橘红色荧光。正常细胞和凋亡细胞膜功能完好，PI不能进入细胞，故不发红色荧光。

荧光探针Ho.33342是一种特异性DNA标记物，主要结合于A-T碱基区，由于它的亲脂性，可以进入活细胞中标记DNA（也可以进入死细胞），因此，对正常细胞、凋亡细胞和坏死细胞都可以进行标记。在紫外光激发下，正常细胞和凋亡细胞都发出明亮的蓝色荧光，坏死细胞因PI发出的强橘红色荧光而被遮盖。所以从颜色上很容易将坏死细胞区分出来；再根据染色质凝集程度和凋亡小体区分正常细胞与凋亡细胞。

【实验用品】

（1）器材：荧光显微镜、载玻片、盖玻片、小平皿、吸管、吸水纸。

（2）试剂：Ho.33342、PI试剂盒（PI：100μg/ml，Ho.33342：20μg/ml）。

（3）材料：人肝癌HepG2细胞。

【方法与步骤】

（1）取出24孔板中的盖玻片放入小皿中（注意保持细胞面朝上），用0.01mol/L的PBS洗3次，每次5min；

（2）滴加荧光染料PI / Ho.33342于盖玻片上[①]，置37℃湿盒中温育30min；

（3）0.01mol/L的PBS洗6次，每次5min；

（4）封片：将细胞面朝下用90%碱性甘油[②]封片；

（5）荧光显微镜下观察：激发光为紫外光；

【观察与结果】

在紫外光激发下，正常HepG2细胞和凋亡细胞核都发出明亮的蓝色荧光，坏死细胞发红色荧光。正常肝癌细胞核荧光均匀，而凋亡细胞核凝集的染色质发强蓝色荧光，周围可见带蓝色荧光的凋亡小体（图5-6）。

---

① 试剂盒中荧光染料浓度：PI：100μg/ml、Ho.33342：20μg/ml，染色前将两种染料1：1混合，按平均每张细胞爬片40μl（PI和Ho.33342各20μl）的量滴加，使终浓度为PI：50μg /ml/Ho.33342：10μg/ml。

② 90%碱性甘油配制：9份甘油加1份0.1mol/L PBS。

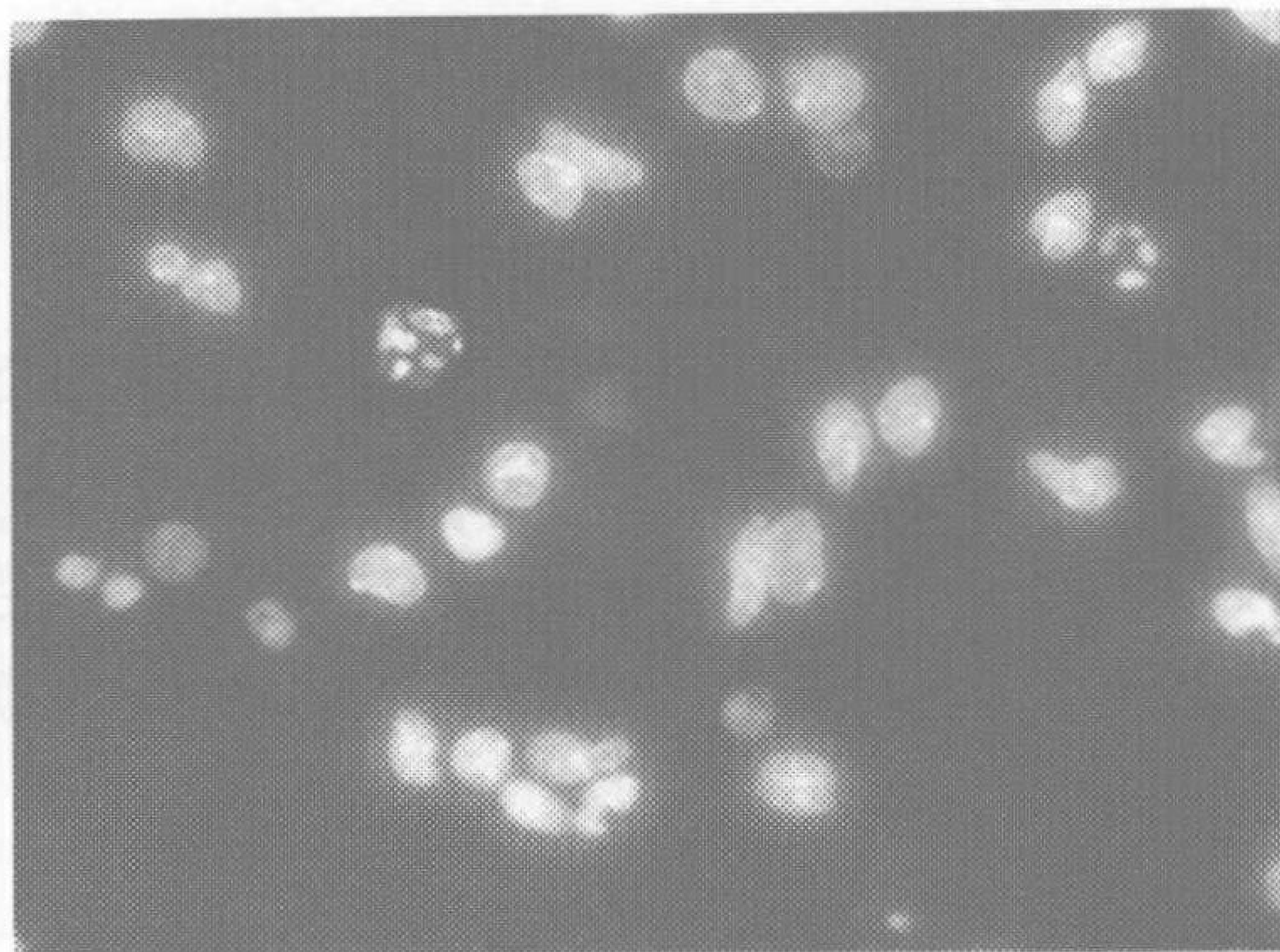


图 5-6　PI / Ho. 33342 双染显示凋亡与坏死细胞

【注意事项】

（1）荧光探针的储存和标记都要保持在暗环境中进行。

（2）对培养细胞进行荧光染料 PI / Ho. 33342 染色时，有时细胞容易脱落，可以在小盖玻片上预先包被多聚赖氨酸后再接种细胞。

（辛华）

5.2　凋亡细胞的超微结构观察

电子显微镜的分辨率达 0.2nm，可以在超微结构水平上观察细胞凋亡时各种细胞器的微细结构变化。常用的电子显微镜有两种：即透射电镜和扫描电镜，透射电镜主要用来观察凋亡细胞内部的超微结构；扫描电镜适用于观察凋亡细胞表面结构。

5.2.1　透射电镜观察凋亡细胞

【实验原理】

凋亡细胞在透射电镜下最具有特征性：在细胞凋亡早期，细胞体积变小，细胞浆浓缩，其内的细胞器保存较好或轻度增生。线粒体轻度肿胀。细胞质内可见较多空泡。细胞核染色质发生边集，在靠近核膜边缘聚集呈新月形，随之染色质发生块状固缩，电子密度增强，核形不规整，核膜表面凹凸不平，核发生碎裂，在细胞质内可见多个电子密度增强的核碎片。有些凋亡细胞周围有由膜包裹凸起于细胞表面的凋亡小体，小体内可见裂解的核碎片或内质网、线粒体、高尔基体等其他细胞结构。整个过程中细胞膜、溶酶体膜保持完整。这些细胞内部发生的各种特征性形态变化均可通过透射电镜观察到。

【实验用品】

（1）仪器设备：细胞培养设备仪器、透射电镜、超薄切片机。

（2）实验用品：细胞培养常规用品。

（3）试剂：细胞培养常规试剂、大蒜素、2.5%戊二醛、梯度酒精、90%丙酮、无水丙酮、环氧树脂 Epon812、DDSA、MNA、DMP-30、乙酸铀染液、枸橼酸铅染液。

（4）实验材料：人肝癌细胞株 BEL-7402 细胞。

【方法与步骤】

将人肝癌 BEL-7402 细胞接种在 25ml 培养瓶中，在对数生长期加入大蒜素（60 mg/L），37℃、5%CO_2、饱和湿度条件下继续培养 3～4h，吸出培养液，用 PBS 轻轻冲洗细胞 2 次，0.25%的胰蛋白酶消化细胞，加等量培养液终止消化，吹打悬浮细胞，1000r/min 离心 5～10min，弃去上清液，加入 5～6ml 培养液洗涤细胞，2000r/min 离心 10min，弃上清，用 2.5%戊二醛固定细胞，1%锇酸后固定，丙酮脱水，618 包埋剂包埋，超薄切片后用乙酸铀及柠檬酸铅染色 H-800 电镜观察。

【观察与结果】

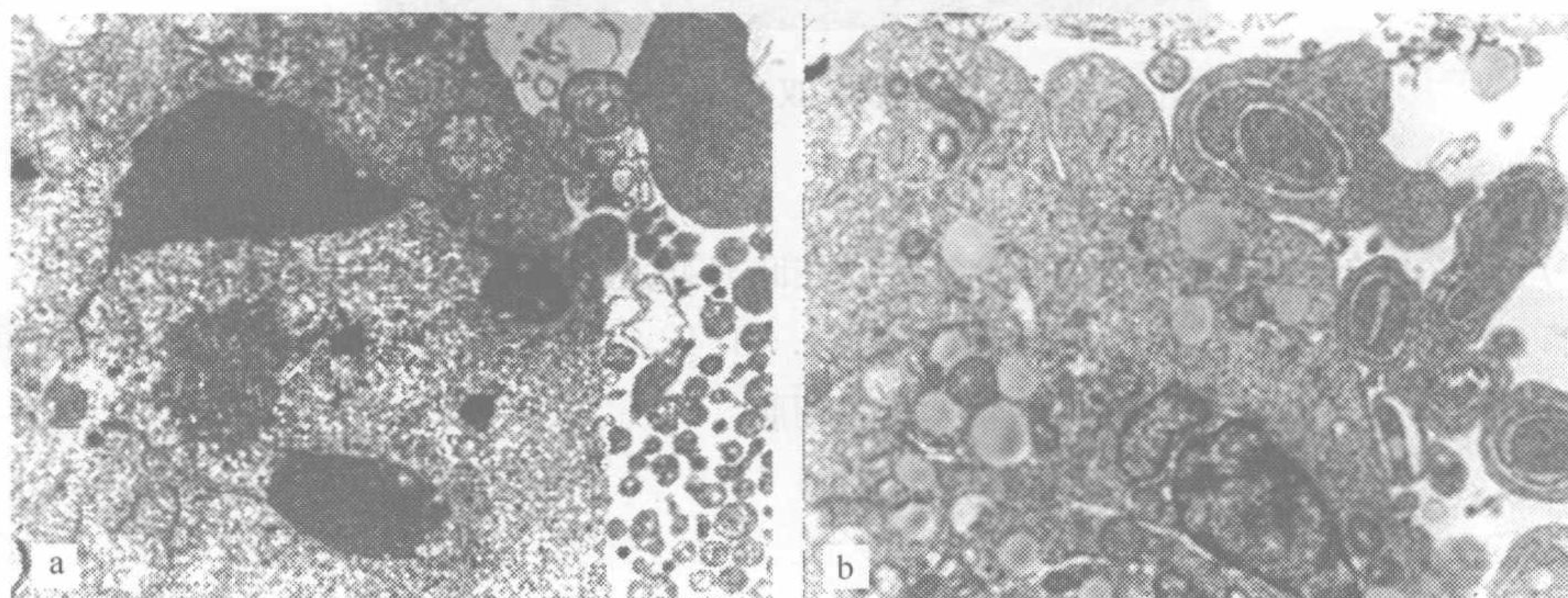


图 5-7　大蒜素诱导的人肝癌 BEL-7402 细胞凋亡透射电镜照片

a. 凋亡细胞染色质边集；b. 透射电镜下的凋亡小体

透射电镜下正常 BEL-7402 细胞核大，核仁明显，内质网、线粒体、高尔基体等结构清晰。凋亡细胞体积缩小，电子密度增高，胞质内质网、线粒体、高尔基体结构完整，染色质聚集靠近核膜周边，呈高电子密度块状；凋亡细胞周围有许多由膜包裹的凋亡小体，部分凋亡小体内部可见膜状结构（图 5-7）。

（辛华）

5.2.2　扫描电镜观察凋亡细胞

【实验原理】

扫描电镜可以在亚细胞水平上生动地显现生物样品的三维结构。它可以用来观察凋亡细胞表面形貌，如细胞体积缩小，细胞表面微绒毛减少或完全消失以及在凋亡细胞周围形成的大小不等的凋亡小体。

【实验用品】

（1）仪器：扫描电子显微镜（SIEMENS-AUTOSCAN）。

（2）试剂：大蒜素、2.5%戊二醛。

（3）实验材料：人肝癌细胞株 BEL-7402 细胞。

【方法与步骤】

将人肝癌 BEL-7402 细胞接种在塑料培养瓶皿中，在对数生长期加入大蒜素（60 mg/L大蒜素），37℃、5%CO_2、饱和湿度条件下继续培养 3～4h。吸出培养液，用

PBS 轻轻洗细胞 2～3 次，用 2.5%戊二醛固定后，梯度乙醇脱水，临界点干燥后真空喷镀，扫描电镜观察。

【观察与结果】

正常肝癌 BEL-7402 细胞表面有大量微绒毛；发生凋亡的细胞体积缩小，细胞表面微绒毛减少甚至消失；部分凋亡细胞表面有许多大小不等的球状凋亡小体（图 5-8）。

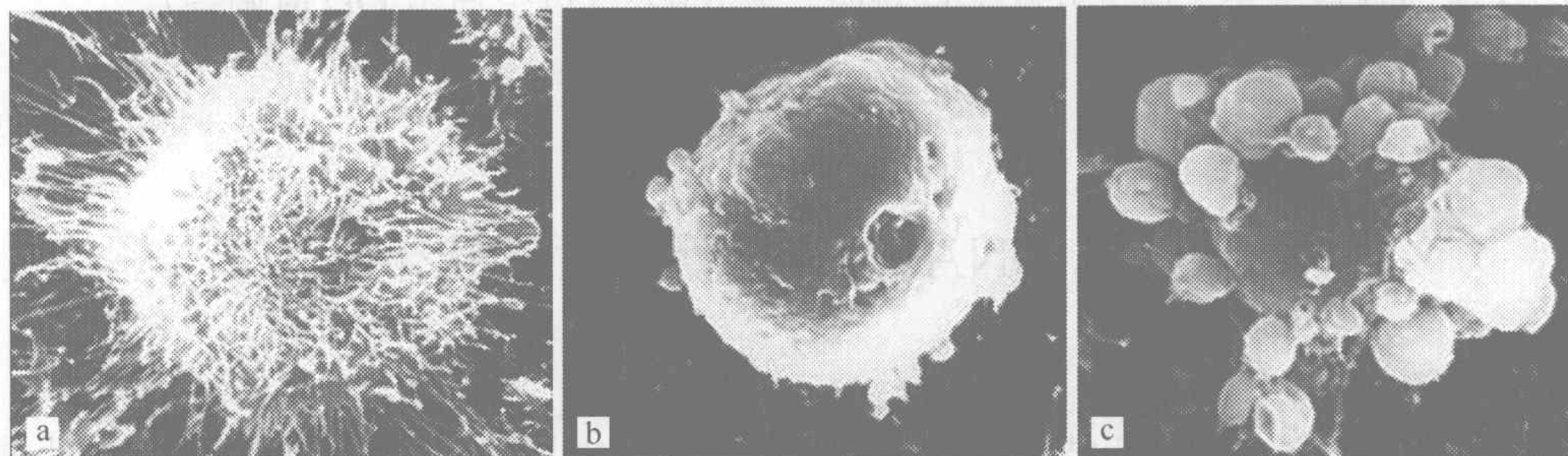


图 5-8　扫描电镜下的凋亡细胞

a. 正常肝癌细胞表面；b. 凋亡细胞体积缩小，细胞表面微绒毛减少甚至消失；c. 凋亡细胞表面有许多大小不等的球状凋亡小体

（辛华）

5.3　凋亡细胞琥珀酸脱氢酶活性检测（MTT 法）

【实验原理】

活细胞线粒体内膜上的琥珀酸脱氢酶（SDH）可将黄绿色的 MTT（一种接受氢离子的染料）降解成蓝紫色的甲臜（formazan），生成量仅与活细胞数目成正比，而死细胞线粒体琥珀酸脱氢酶活性消失，不能将 MTT 还原。将其溶解后用酶联仪测定甲臜的含量（光密度 OD 值），可以定量反映出活细胞存活比率。

【实验用品】

（1）仪器设备：Thermo multiskan MK3 全自动酶标仪、细胞培养设备仪器。

（2）实验用品：细胞培养常规用品，微量加样器。

（3）试剂：大蒜素、25mg MTT 溶于 pH7.4 PBS 5ml 中，过滤除菌。

（4）实验材料：人肝癌 HepG2 细胞。

【方法与步骤】

（1）将人肝癌 HepG2 细胞以 5×10^3 个/（100μl · 孔）密度接种于 96 孔板中，在对数生长期进行分组实验：设空白组、正常对照组、大蒜素诱导组（空白组不加细胞、正常对照组不加大蒜素）。

（2）药物作用终止前 4h，于各孔加入 5mg/ml MTT 20μl，细胞放回培养箱继续培养 4h 后终止培养。

（3）小心吸弃孔内培养上清液（对于悬浮细胞需要离心后再吸弃孔内培养上清液）。每孔加入 100μl DMSO，振荡 10～20min，使结晶物充分溶解。

（4）使用酶标仪测定各孔光密度值，测试波长 570nm。各组 OD 值取均值后，计算

存活细胞百分数。

【观察与结果】

(1) 加 MTT 4h 后，倒置相差显微镜下观察可见黄色的 MTT 被还原成紫蓝色颗粒，加 DMSO 后紫蓝色颗粒溶解。

(2) 计算存活细胞百分数：各组 OD 值取平均值后，以下面公式计算存活细胞百分数：存活细胞数%＝（OD 实验/OD 对照）×100%（以空白组 OD 值调零）。

（辛华）

5.4 DNA 电泳检测凋亡梯状带

【实验原理】

细胞凋亡最突出的生化特征是由于凋亡细胞核酸内切酶的活化，使染色质核小体之间的连接处断裂，裂解成长度为 180～200bp 及其倍数的 DNA 片段，在琼脂糖凝胶电泳上呈现 DNA 梯形电泳图谱，即梯状（DNA ladder）带。培养细胞经诱导凋亡处理后，采用常规方法分离提纯 DNA，进行琼脂糖凝胶电泳分离、纯化 DNA 片段和溴化乙锭染色，在凋亡细胞群中可观察到典型的 DNA ladder。

【实验用品】

1. 器材

细胞培养常规设备、电泳仪、高速低温离心机、电泳槽、凝胶成像系统、25ml 培养瓶、微量加样器、加样枪头。

2. 试剂

细胞培养常规试剂、琼脂糖凝胶、大蒜素。

(1) 0.5×TAE 电泳缓冲液。

(2) PBS（NaCl 4g、KCl 0.1g、$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ 0.78g、KH_2PO_4 0.01g、定容至 500ml，调 pH 至 7.2～7.4）。

(3) 溶解缓冲液［20mmol/L EDTA，100mmol/L Tris，pH8.0，0.8%（*m/V*）SDS］。

(4) RNA 酶 A，蛋白酶 K（20mg/ml）。

3. 材料

人肝癌 HepG2 细胞株。

【方法与步骤】

(1) 细胞培养与凋亡诱导：用 25ml 培养瓶体外培养人肝癌 HepG2 细胞，2～3d 传一代，在对数生长期诱导细胞凋亡，加入大蒜素（60mg/L 大蒜素），继续培养 4 h；

(2) 细胞收集：将 5×10^5 个细胞移入无菌的 1.5ml Eppendorf 管中，在 4℃ 2000 r/min 离心 5min，弃上清，用预冷的 PBS 再洗涤一次；

(3) 加入20μl溶解缓冲液，混匀细胞沉淀；

(4) 加10μl RNA酶A (500U/ml)，轻弹管尖混匀，不要形成漩涡。37℃孵育30～120min；

(5) 加10μl蛋白酶K (20mg/ml)，轻弹管尖混匀，50℃孵育至少90min，也可过夜；

(6) 加入DNA上样缓冲液，用1%～2%琼脂糖凝胶进行电泳，低电压电泳 (2～4V/cm)；

(7) EB染色，凝胶成像仪进行检测。

【结果与观察】

见图5-9。



图5-9 凋亡细胞DNA电泳凝胶成像后，呈现明显的弥散条带，显示凋亡细胞DNA降解片段所形成的梯度。其中M为DNA marker，指示DNA分子质量大小，泳道1、2、3分别是细胞经凋亡诱导剂诱导处理细胞，作用不同时间后提取DNA后进行凝胶检测。在胶顶部，是一个高分子质量条带，自上而下为弥散的DNA条带

【注意事项】

(1) 建议使用宽口移液管移取基因组DNA，以避免DNA的剪切。注意不要使用过多的细胞，否则随后的酶解可能不完全，形成很黏稠的DNA溶液。

(2) 混匀时注意不要形成强的漩涡，因为高分子质量DNA可能被剪切；尽量不要产生气泡，导致不能充分混匀沉淀。

(3) 加入RNA酶A/TE混合液、蛋白酶K后，注意用封口膜将EP管封好，以免EP管中的液体蒸发。

(4) 低电压电泳，可以促进DNA片段的分离。

(苑辉卿)

5.5 细胞膜磷脂酰丝氨酸荧光显示

【实验原理】

磷脂酰丝氨酸 (PS) 在非凋亡细胞中分布于细胞内膜，细胞凋亡早期膜磷脂不对称丢失使磷脂酰丝氨酸由胞膜内层暴露于胞膜外，磷脂酰丝氨酸暴露于胞膜外可作为凋亡细胞的标志。Annexin-V是一种分子质量为35～36kDa的Ca^{2+}依赖性磷脂结合蛋白，能与PS高亲和力特异性结合。将Annexin-V进行荧光素FITC标记，以标记了的AnnexinV-FITC作为荧光探针，利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生。碘化丙锭 (PI) 是一种核酸染料，它不能透过完整的细胞膜，但在凋亡中晚期的细胞和死细胞，由于细胞膜损伤，通透性增加，PI能够透过细胞膜和细胞核酸结合。因此将Annexin-V与PI匹配使用，就可以将凋亡早晚期的细胞以及死细胞区分开来。

【实验用品】

(1) 器材：低温离心机、流式细胞仪、细胞计数板、光学显微镜、1.5ml离心管、微量加样器等。

(2) 试剂与药品：0.25%胰蛋白酶、含10%新生牛血清培养基、BD ApoAlert™ Annexin V试剂盒 (内含Annexin V-FITC，20μg/ml；1×Binding Buffer；Propidium

Iodide，50 μg/ml）。

（3）材料：诱导凋亡细胞。

【方法与步骤】

（1）用流式细胞术检测贴壁细胞凋亡时，用 0.25%胰蛋白酶消化细胞后，加入含10%新生牛血清培养基终止胰酶作用；用流式细胞仪检测悬浮细胞凋亡，直接从第 2 步开始；

（2）1000r/min，离心 5min（4℃）；

（3）用 1ml 1×Binding Buffer 漂洗 1×10^5～1×10^6 细胞；

（4）1000r/min，离心 5min（4℃）；

（5）用 200μl 1×Binding Buffer 将 1×10^5～1×10^6 细胞重悬；

（6）加入 5μl Annexin V-FITC 和 10μl 50μg/ml propidium iodide，避光室温反应5～15min；

（7）加入 300μl1×Binding Buffer，流式细胞仪检测。

【结果与观察】

在双变量流式细胞仪的散点图上，左下象限显示活细胞，为（$FITC^-/PI^-$）；右上象限显示死细胞，为（$FITC^+/PI^+$）；而右下象限显示凋亡细胞，显现（$FITC^+/PI^-$）。

【注意事项】

（1）整个操作动作要尽量轻柔，避免因操作而造成细胞损伤，并尽量在 4℃进行。

（2）AnnexinV-FITC 和 propidium iodide 是光敏物质，在操作时请注意避光。

（3）由于细胞凋亡是一个动态、非常迅速的过程，因此反应完毕后应尽快检测。

（4）此外，AnnexinV-FITC 染色检测凋亡还可以在荧光显微镜下观察，正常细胞无着色，凋亡细胞发绿色荧光（PS 被 Annexin V-FITC 标记发绿色荧光），坏死细胞和晚期凋亡细胞因为膜结构不完整被 PI 标记而发红色荧光，细胞膜表面呈现绿色光晕。

（朱庆均）

5.6 凋亡细胞原位末端标记

细胞凋亡中染色体 DNA 的断裂是个渐进的分阶段的过程，染色体 DNA 首先在内源性的核酸水解酶作用下降解为 50～300kb 的大片段，然后大约 30%的染色质 DNA 在 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 依赖的核酸内切酶作用下，核小体单位间的 DNA 被随机切断，形成180～200bp 核小体 DNA 多聚体。DNA 双链断裂或只要一条链上出现缺口就会产生一系列 DNA 的 3′-OH 端，在脱氧核糖核酸末端转移酶（TDT）的作用下，将脱氧核糖核酸和荧光素、过氧化物酶、磷酸化酶或生物素形成的衍生物标记到 DNA 的 3′-端，就可进行凋亡细胞的检测，这类方法称为脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法（terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling，TUNEL）。由于正常的或正在增殖的细胞几乎没有 DNA 的断裂，因而没有 3′-OH 形成，很少能够被染色。TUNEL 法实际上是分子生物学与形态学相结合的研究方法，对完整的凋亡细胞核

或凋亡小体进行原位染色，能准确的反映细胞凋亡最典型的生物化学和形态特征，并可检测出极少量的凋亡细胞，灵敏度远比一般的细胞化学法和 DNA Ladder 测定法要高，因而在细胞凋亡的研究中被广泛采用。

生物素（biotin）标记的 dUTP 在 TDT 酶的作用下，可以掺入到凋亡细胞的双链或单链 DNA 的 3′-OH 端，并可与连接了过氧化物酶（POD）的亲和素（streptavidin）特异结合，在 POD 底物（DAB）存在下，可产生很强的颜色反应，特异准确地定位正在凋亡的细胞，因而在普通光学显微镜下即可观察和计数凋亡细胞。

【实验用品】

1. 器材

湿盒、恒温水浴锅、恒温箱、光学显微镜。

2. 试剂

1）0.2% Triton X-100 溶液

将 Triton X-100 溶于 PBS 中，至终浓度 0.2%（*V/V*）。

2）0.3% H_2O_2

1ml H_2O_2（30%）加 99ml 去离子水。

3）TDT 缓冲液（pH7.2）新鲜配制

3.63g　Trizma 碱

29.96g　$(CH_3)AsO_2Na \cdot 3H_2O$（二甲胂酸钠）

0.238g　$CoCl_2 \cdot 6H_2O$（氯化钴）

溶于 990ml 去离子水，用 0.1mol/L HCl 调节 pH 至 7.2，再加去离子水至 1000ml。

4）SSC 缓冲液

17.4g　NaCl

8.82g　柠檬酸钠

加去离子水至 1000ml。

5）2%牛血清蛋白（BSA）

2.0g BSA 溶于 100ml 去离子水。

6）TDT 酶/生物素-dUTP 混合液

168ml　TDT 缓冲液

1ml　TDT 酶（promega，5U/ml）

1ml　生物素-dUTP

7）亲和素-过氧化物酶工作液

用含 1%BSA 的 PBS 将亲和素-过氧化物酶（strepavigen，biogenex）稀释 80～100 倍。

8）PBS（pH 7.4）

K_2HPO_4　1.392g

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$　0.276g

NaCl　　　　　　　　8.770g

先溶于 900ml 去离子水，然后用 0.01mol/L KOH 调 pH 至 7.4，并补足去离子水至 1000ml。

9）二氨基联苯胺（DAB）工作液（新鲜配制，避光保存）

5mg　DAB

10ml　PBS，pH7.4

临用前过滤，加 0.02%（*V/V*）H_2O_2。

10）苏木精染液

常规配制。

【方法与步骤】

（1）细胞爬片放入 4%多聚甲醛，室温中固定 25min。

（2）PBS 洗 2 次，每次 5min。

（3）将细胞爬片浸泡在 0.2% Triton X-100 溶液中，室温放置 5min。

（4）PBS 洗 2 次，每次 5min，置 2%过氧化氢中 5min，以灭活内源性过氧化氢酶。

（5）PBS 洗 2 次，每次 5min，TDT 缓冲液洗 1 次。

（6）用吸水纸仔细去除多余液体后，在细胞爬片上滴加 100μl TDT 酶/生物素-dUTP 混合液中，用塑料盖玻片覆盖，放在湿盒中 37℃反应 1h，注意避免干片。

（7）去除塑料盖玻片，将细胞爬片移至 SSC 缓冲液中，室温下浸泡 15min 终止反应。

（8）PBS 洗 3 次，每次 5min。置 2%BSA 中，室温封闭 10min。

（9）PBS 洗 2 次，每次 5min。

（10）在细胞爬片上滴加 100μl 1∶80 稀释的亲和素-过氧化物酶，37℃作用 30min。

（11）PBS 洗 2 次，每次 5min。

（12）在细胞爬片上滴加 50μl DAB 工作液中，室温反应 5～10min，镜下观察至背景出现浅棕色。

（13）去离子水洗 2 次终止显色反应，苏木精常规染色 5min。

（14）水洗 3 次，依次用梯度乙醇脱水，二甲苯透明，树胶封片，干燥后观察。

【注意事项】

（1）一定要有阳性和阴性细胞对照。阳性对照的切片可使用 DNaseⅠ降解的标本；阳性细胞对照可使用地塞米松（1mmol/L，3～4h）处理的大、小鼠胸腺细胞。阴性对照不加 TDT 酶，其余步骤与实验组相同。

（2）TDT 酶/生物素-dUTP 混合液即用即配。

（3）DAB 显色时注意时间不要过长，避免背景染色过深，影响结果分析。

（4）对细胞爬片的操作要轻柔以避免细胞脱片。

【观察结果】

在光学显微镜下观察，可见凋亡细胞在紫蓝色背景下有深褐色斑状物质。

（朱庆均）

参考文献

姜泊. 1999. 细胞凋亡基础与临床. 北京：人民军医出版社. 9～14

李素文. 2004. 细胞生物学实验. 北京：高等教育出版社. 68～75

辛华. 2004. 细胞生物学实验. 北京：科学出版社. 188～198

章静波. 2002. 组织和细胞培养技术. 北京：人民卫生出版社. 240～255

第6章　细胞工程

细胞工程（cell engineering）是生物工程（biotechnology）的一个组成部分，它是指用生物学和分子生物学方法，有计划地改变细胞的结构或遗传物质，以产生人们需要的生物新品种。由于它在基础理论研究和生产实际应用中具有重要意义，已成为当今生命科学新技术革命的前沿。

细胞工程涉及的范围十分广泛，所采用的技术也多种多样，如细胞培养技术、细胞融合技术、细胞器移植和细胞重组技术、体外受精技术、染色体工程技术、DNA重组和基因转移技术等。利用这些技术可以从细胞水平、核质水平、染色体水平，以及基因水平等不同层次将细胞加以改造，有效地控制生物类型，造福于人类。在这里有代表性地介绍细胞工程技术中最基本、最常用的几种技术。

6.1　细胞融合

细胞融合（cell fusion）是指两个或两个以上的同源或异源细胞合并成为双核或多核细胞的过程。细胞融合包括质膜的连接与融合，胞质合并，细胞核、细胞器和酶等互成混合体系。通过细胞融合可以形成两类多核细胞，一类多核细胞中含有来自同一种亲本的核，称为同核体（homokaryon）；而另一类融合细胞中含有分别来自两个亲本的核，称为异核体（heterokaryon）。只有异核体才属于杂种细胞。常用的细胞融合方法主要有病毒诱导法、化学诱导法和电融合三种方法。本章重点介绍化学诱导法（聚乙二醇诱导融合）和电融合法。

细胞融合技术广泛应用于细胞生物学、遗传学、病毒学、肿瘤学的研究，在细胞周期调控的研究、基因定位、基因表达产物检测、细胞对病毒敏感因素的分析、肿瘤细胞恶性分析、生物新品种培育及单克隆抗体技术等领域有着非常广泛的应用前景。

6.1.1　聚乙二醇介导的细胞融合

【实验原理】

聚乙二醇（polyethylene glycol，PEG）是最常用的化学融合剂，分子式为$HOCH_2$-$(CH_2OCH_2)_nCH_2OH$，是乙二醇的多聚化合物，存在一系列不同分子质量的多聚体，PEG可用于多种动物细胞的融合试验。由于PEG具有活性稳定，容易制备和控制等优点，已经成为应用最广泛的标准细胞融合液。

目前普遍认为PEG诱导细胞融合的机制是：PEG可与水分子借氢键结合，在高浓度（50%）的PEG溶液中自由水消失，导致细胞脱水而发生质膜结构的变化，引起细胞融合。因此PEG用于细胞融合至少有两方面的作用：可促使细胞凝聚和破坏互相接触处的细胞膜的磷脂双分子层，使细胞膜之间发生膜融合，细胞质沟通，形成双核或多核融合细胞。

选择合适的分子质量、浓度及作用时间是PEG融合技术的关键。PEG相对分子质量在200～6000范围之内者均可用作细胞融合，其中以分子质量1000～4000的促融合效果更好些。使用50%PEG溶液所产生的杂种细胞最多。更高浓度的PEG虽然可以发挥良好的促进细胞融合的作用，但容易造成细胞脱水而使细胞受到破坏。

本节将以鸡的红细胞和体外培养的人肝癌HepG2细胞为例，介绍PEG诱导的细胞融合。

6.1.1.1 鸡血红细胞的融合

【实验用品】

1. 器材

离心机、显微镜、天平、水浴锅、计数板、滴管、10ml离心管、容量瓶、广口瓶、细口瓶、烧杯、注射器、盖玻片、载玻片。

2. 试剂

Alsever溶液、GKN溶液、50%PEG、甲醇、0.85%生理盐水、Giemsa染液或HE染液。

1）Alsever溶液

葡萄糖	2.05g
柠檬酸钠	0.80g
NaCl	0.42g

溶于100ml双蒸水中。

2）0.85%生理盐水

称取NaCl 0.85g，溶于100ml双蒸水中。

3）GKN溶液

NaCl	8g
KCl	0.40g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	1.77g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0.69g
葡萄糖	2g
酚红（phenol red）	0.01g

溶于1000ml双蒸水中。

4）50%PEG

称取一定量的PEG（相对分子质量为4000）入烧杯，沸水浴加热，使之熔化，待冷却至50℃时，加入等体积预热至50℃的GKN溶液，混匀，置入37℃备用。

3. 材料

成年公鸡。

【方法与步骤】

1. 取材

在注射器内吸入 2ml Alsever 溶液，从鸡翼下静脉取 2ml 鸡血，注入离心管，再加入 6ml Alsever 溶液，使之成为 1∶4 的细胞悬液，混匀后放入冰箱备用。

2. 洗细胞

取 1ml 细胞悬液放入离心管中，加入 4ml 0.85％生理盐水，混合均匀后，离心（800r/min，3min），弃上清液，再用 0.85％生理盐水重复洗细胞 2 次，最后加入 4ml GKN 液洗涤一次，离心收集细胞。

3. 制备细胞悬液

在细胞中加入 GKN 液（体积比 1∶9），制成 10％的细胞悬液，取细胞悬液计数后，用 GKN 溶液调整细胞密度至 3×10^7～4×10^7 个/ml。

4. 细胞融合

（1）取调整好细胞密度的细胞悬液 1ml 放入离心管中，置 37℃水浴锅中预热，同时也将 50％PEG 溶液放入水浴锅中预热备用。

（2）待温度恒定后，在 1ml 细胞悬液中慢慢逐滴加入 0.5ml 预热的 50％PEG（沿离心管壁缓缓加入融合剂），边加边摇匀，然后再放入 37℃水浴锅中作用 30～40min。

（3）在试管中加入 GKN 溶液至 8ml，于 37℃水浴中静置 20 min。

5. 终止反应

取出离心管，离心（800r/min，3 min），弃上清液后，加入 GKN 溶液悬浮细胞，再次离心收集细胞。

6. 制片和染色

在离心管内加入少量 GKN 溶液，充分混匀后取出少量细胞悬液，制备细胞涂片。细胞干燥后用甲醇固定 10min，晾干后用 Giemsa 染液染色 8～12min，水洗（或 HE 染色），干燥后在显微镜下观察细胞融合情况。

【观察与结果】



图 6-1　鸡血红细胞的融合（HE 染色）

高倍镜下观察，鸡的红细胞为椭圆形。HE 染色结果细胞质染成粉红色，细胞核位于细胞中央，蓝色，可以见到部分融合后的双核细胞（图 6-1）。融合率计算：

融合率＝视野内发生融合的细胞核总数/视野内所有细胞核总数×100％

【注意事项】

（1）实验开始时需将 GKN 溶液和 PEG 溶液放入水浴锅中预热，用已经预热的 GKN 溶液制备

细胞悬液可以提高融合效率。

(2) PEG对细胞具有毒性作用，当PEG接触细胞时要边加边摇均匀。

6.1.1.2 培养细胞的融合

【实验用品】

(1) 器材：离心机、刻度离心管、0.5ml刻度滴管、吸管、水浴锅、载玻片、盖玻片。

(2) 试剂：0.25%胰蛋白酶液、50%的PEG溶液、D-Hank's溶液、Giemsa染液。

(3) 材料：人肝癌细胞HepG2细胞。

【方法与步骤】

(1) 用胰蛋白酶消化法收集贴壁培养的HepG2细胞，离心（800r/min，3min）。弃上清后加入D-Hank's溶液制成细胞悬液，同法再离心1次，以洗去残留血清。

(2) 弃上清后保留下层细胞及少量上清液共计0.1ml，轻弹离心管下方使之成为细胞悬液。逐滴加入37℃的50%PEG溶液0.5ml，边加边摇匀细胞悬液，90s内加完。

(3) 随即缓慢加入5ml D-Hank's溶液以稀释终止PEG的作用，边加边轻摇离心管。

(4) 然后静置于37℃水浴5min。取出离心管，离心（800r/min，3min），弃上清后加2ml D-Hank's溶液混匀后制成细胞悬液。

(5) 取少量悬液于载玻片上制成涂片，迅速干燥，将细胞涂片置于甲醇中固定10min，取出后晾干，Giemsa染液染色，水洗，干燥，显微镜下观察细胞融合情况。

【实验结果】

得到的融合细胞有双核至多核，总的细胞融合率一般为10%～30%，见图6-2。

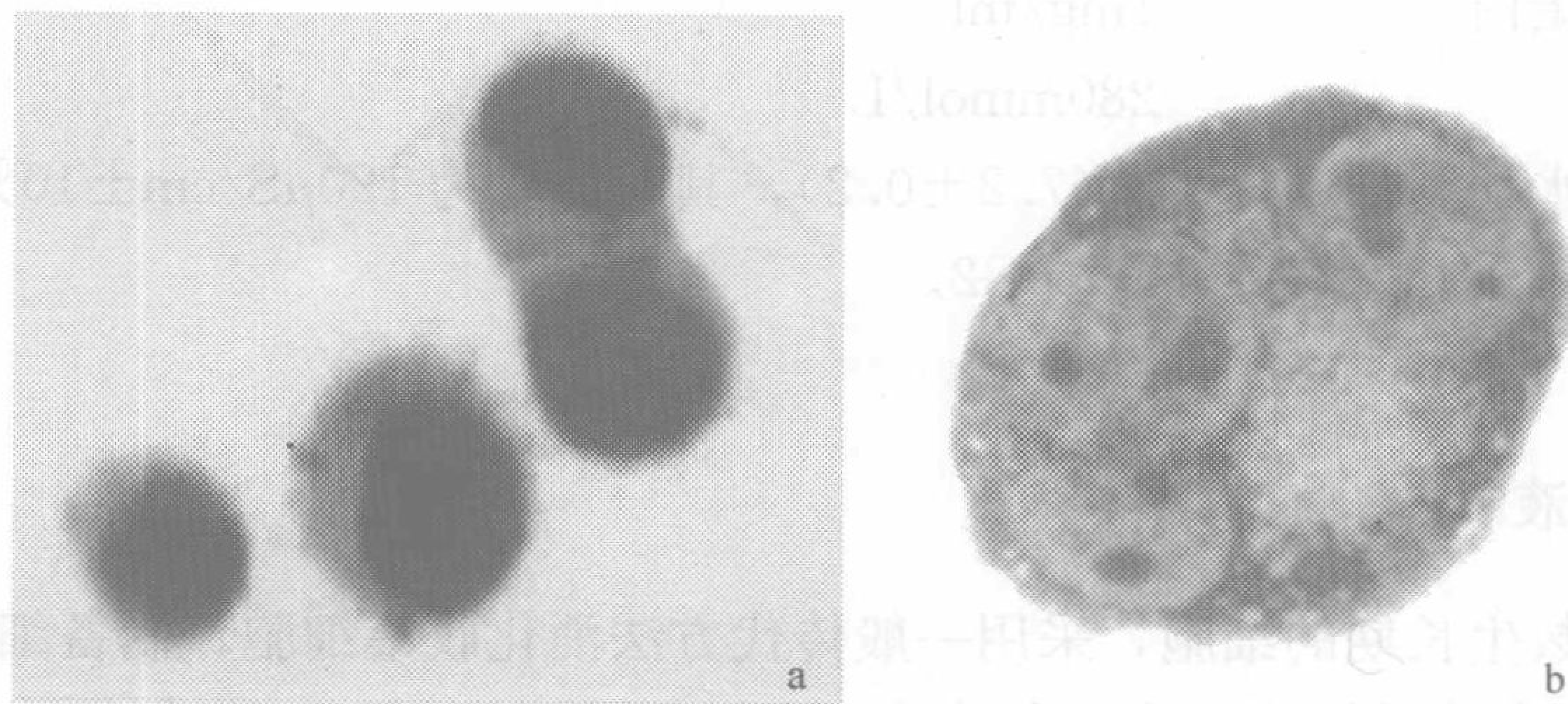


图6-2 人肝癌HepG2细胞的融合（Giemsa染色）

a. 双核细胞；b. 多核细胞

（李霞）

6.1.2 细胞电融合

【实验原理】

细胞电融合技术就是使细胞在电场中被极化成偶极子，并沿电力线排列成串，然后用高频直流脉冲击穿细胞膜而导致细胞融合在一起。由于这种融合技术具有容易控制、

融合效率高、无毒性的优点，发展迅速。新近发展的微电融合仪因具有操作方便、快速、经济的特点而被广泛使用。本实验以 Multiporator 4308 型细胞微电融合仪为例（图 6-3），介绍电融合的过程。



图 6-3　Multiporator 4308 型细胞融合仪

【实验用品】

（1）器材：低速离心机、刻度离心管、移液管、吸管、细胞计数板、培养瓶或培养板、CO_2 培养箱、Multiporator 4308 电融合仪、倒置相差显微镜。

（2）试剂：RPMI 1640 培养液、小牛血清、0.25%胰蛋白酶液、融合液（PM 液）。

融合液（PM 液）配制：

乙酸钙	0.1mmol
乙酸镁	0.5mmol
牛血清白蛋白	1mg/ml
山梨糖醇	280mmol/L

无菌三蒸水配制，调整 pH（7.2±0.2），其电导率为 120μS/cm±10%。

（3）材料：人肝癌细胞系 HepG2。

【方法与步骤】

1. 细胞悬液制备

取处在对数生长期的细胞，采用一般传代方法消化收集细胞，制备细胞悬液。用融合液（PM）洗涤悬浮细胞两次（每次离心 1000r/min，5min）收集细胞，计数，用新鲜融合液调整细胞密度为 3×10^7 个 / ml。

2. 设置电融合参数

（1）将悬浮细胞转移到相应的融合室内。

（2）接通电源，打开仪器开关，屏幕提示出现真核细胞电转化工作模式。重新选择 MODE 按钮至真核细胞电融合工作模式（⊙⊙）。

（3）预实验选择工作参数，可先在微融合杯中用少量细胞摸索最佳融合条件，设置不同的电融合参数，在倒置相差显微镜下观察细胞融合效果（检测细胞是否排成一条

链，调节振幅和频率以达到最佳效果），然后正式设置电融合参数。

(4) 按SET键设定目标参数。以人肝癌细胞系 HepG2 为例，设置脉冲前电压为6.5V，工作时间60s；脉冲工作电压为300V，工作时间60μs，3次；脉冲后电压6.5V，工作时间60s（图6-4）。设置后的参数立即生效。

U'~6.5V	t 60s	
U⊓ 300V	t 60μs	n3
U''~6.5V	t 60s	

图6-4 电融合仪屏幕显示的测试参数
U'~为脉冲前电压，U⊓为脉冲工作电压，U''~为脉冲后电压；t为工作时间

3. 进行电融合

按开始键（START）工作。屏幕提示充电（Charge），充电结束后开始放电，同时屏幕开始闪动。实验结束后，仪器发出双声提示，屏幕显示工作状态参数。

4. 细胞电融合后处理

用培养液洗涤细胞2次（离心1000r/min，5min），计数调整细胞密度并转移到培养瓶（或24孔或96孔培养板），补足细胞培养液，37℃、5%CO_2、饱和湿度条件下培养。

5. 杂交细胞培养

一般在融合实验后经过选择培养，4d后可观察到杂交细胞克隆。

【观察与结果】

倒置相差显微镜下观察，悬浮状态的人肝癌HepG2细胞在融合前呈圆形，散在分布在融合液中，在电场的作用下细胞排列成串，细胞在融合过程中聚集，可见部分细胞发生了融合（图6-5）。

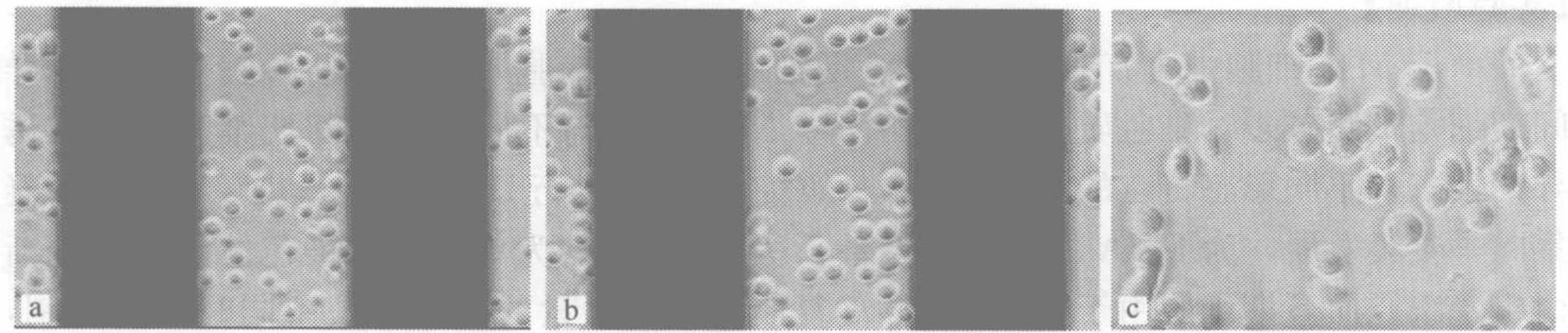


图6-5 电诱导HepG2细胞的融合
a. 细胞融合前（×100倍）；b. 正在移动中的细胞（×100倍）；c. 部分细胞发生了融合（×200倍）。a、b中两条平行的黑线是微电极

【注意事项】

(1) 为保证融合结果的一致性，要求具有高阻抗的培养基以避免过量的热量储存，且pH、渗透压浓度、二价阳离子浓度、无菌性和内毒素水平等都要进行很精确的控制。

(2) 电融合中的主要参数包括交流电压、交变电场的振幅频率、交变电场的处理时间、直流高频电压、脉冲宽度、脉冲次数等。这些参数依细胞种类的不同而不同，必须通过预实验来确定。

(3) 预实验选择工作参数，可先在微融合杯中用少量细胞摸索最佳融合条件，用倒置相差显微镜观察细胞融合效果（检测细胞是否排成一条链，调节振幅和频率以达到最佳效果），然后优化好的条件直接用于螺旋融合杯上。

(4) 为达到最高融合效率，建议用对数生长期生活状态好的细胞。

(5) 本实验所列操作方法的根据是本仪器所述标准步骤，但不同仪器会有差异，且融合介质的成分在不同的实验室也有所不同。如有的倾向于高离子浓度介质，而大多数实验室倾向于低盐等渗溶液。如果努力优化电压和脉冲宽度等参数后，细胞融合结果依然不令人满意，就应尝试改变融合介质。

（李霞）

6.1.3 早熟染色体凝集的诱导和观察

早熟染色体凝集（premature chromosome condensation，PCC）是近 20 年来在细胞融合和染色体技术的基础上建立起来的一种新技术。在间期细胞中，遗传物质是以染色质形式存在的，看不到分裂期（M 期）才出现的染色体。当把间期细胞与 M 期细胞融合后，由于在 M 期细胞内含有促进染色质凝集的物质——有丝分裂因子（mitotic factor)，现称成熟促进因子（maturation promoting factor，MPF）能诱导间期细胞染色质提前凝集成染色体。此种由 M 期细胞诱导间期细胞中产生的染色体称为早熟凝集染色体（prematurely condensed chromosome，PCC）或称为 PC-染色体。PCC 的形态学反映了间期细胞融合时所处的细胞周期的位置。利用 PCC 技术可以在光镜下直接观察间期细胞中染色质结构的动态变化，可以用于细胞周期的分析、环境中各种理化因子对靶细胞间期染色体损伤效应的研究、白血病人化疗效果及预后的检测及制备高分辨染色体带谱等。

【实验原理】

由于 M 期细胞中含有 MPF，当 M 期细胞与间期细胞融合后，此种因子可以诱导间期细胞核膜破裂，染色质凝集成染色体。M 期细胞与不同时相的间期细胞融合后诱导产生三种不同形态特点的 PC 染色体。如 G_1 期尚未进行 DNA 复制，染色质逐渐由凝集向去凝集发展，为 DNA 的合成做准备，所以 G_1 期均为单股线状染色体，只是逐渐由粗变细；而 S 期细胞由于正处在 DNA 复制阶段，大量的复制单位不同时启动复制，所以正在复制的地方染色质高度解螺旋，在光镜下看不到，只看到还没有进行复制或复制后又重新凝集的部分，故 S 期 PC 染色体在光镜下呈粉末状或粉碎颗粒状；G_2 期 PC 染色体因 DNA 复制已经完成，呈现类似中期染色体的形态为双股染色体，但两条单体多并在一起，边缘光滑而且较细长。

【实验用品】

(1) 器材：超净工作台、恒温箱、离心机、天平、显微镜、吸管、移液管、10ml 离心管、载玻片、盖玻片、酒精灯、试管架、染色盘。

(2) 试剂：50%PEG（MW=1000）、Hank's 溶液、RPMI 1640 培养液或 Eagle 培养液（含 10%小牛血清和不含小牛血清两种）、10μg/ml 秋水仙素、0.25%胰蛋白酶、0.075mol/L KCl 低渗液、甲醇-冰乙酸（3∶1）固定液、Giemsa 染液（pH 6.8 PBS

稀释)。

(3) 材料：CHO或HeLa细胞。

【方法与步骤】

1. M期细胞的准备

将细胞接种于大培养瓶中，在细胞对数生长期加入终浓度为0.05μg/ml的秋水仙素，继续培养3h，使大量分裂的细胞被阻断于分裂中期，形成球形。轻轻倾去培养液，加入5ml Hank's溶液，平行反复振摇培养瓶，使液体冲刷细胞层，或用吸管在瓶内吸取Hank's溶液反复吹打细胞层，由于M期细胞呈球形，与瓶壁的接触面积小，容易脱落悬浮。将细胞悬液移入离心管中，计数备用。

2. 间期细胞的准备

取另一瓶处于对数生长期的细胞，也可采用收集过M期细胞后的贴壁细胞，用0.25%胰蛋白酶消化2～3min，弃去消化液，加入5ml Hank's溶液，用吸管吹打成细胞悬液，计数备用。

3. 细胞融合

(1) 将M期和间期细胞按1∶1（约各为10^6个）混合于离心管中，以800r/min离心5～8min，弃去上清液，用Hank's溶液洗涤离心1～2次，弃去上清液，离心管倒置在滤纸上吸尽残液。

(2) 用手指轻弹离心管底壁使细胞团分散，然后在37℃水浴中逐滴加入0.5～1ml制备好的50%PEG溶液，边加边轻轻振荡，整个过程在60～90s内完成。迅速加入10倍体积无血清RPMI 1640培养液，稀释以终止PEG的作用。在37℃水浴中静置4～5min，然后离心去上清液，再用无血清RPMI 1640液洗涤离心一次，充分去除PEG。

(3) 倾去上清液后，加入2～3ml含小牛血清的RPMI 1640培养液，轻轻吹打使细胞均匀悬浮。37℃温育20～60min。

4. 制片

细胞温育后离心（800r/min，6min），弃去上清液，用手指轻弹离心管，使细胞分散，加入10ml 0.075mol/L KCl低渗液，37℃静置15min，滴入新配制的甲醇-冰乙酸（3∶1）固定液进行预固定，离心（800r/min，6min），弃去上清液，指弹离心管，使细胞分散后加入7ml甲醇-冰乙酸（3∶1）固定液，静置固定20min，离心，弃去上清液。加少量固定液，轻轻吹打制成细胞悬液，按常规染色体制片法滴片，干燥后用Giemsa染液染色12min，水冲洗，晾干。

【观察与结果】

在低倍镜下可观察到片中有未融合的单个间期细胞，融合的双核或多核间期细胞、未融合的M期细胞（具典型中期染色体）以及M期和间期随机融合而诱导产生的不同形态的PCC细胞。根据下列所描述的各期PCC的特征（图6-6），油镜下寻找M期与不同时相间期细胞诱导产生的各期PCC。

1. G_1 期 PCC

G_1 期DNA尚未复制，染色体由单条染色单体组成。随染色体解螺旋的发展，染色体逐渐变长、纤细化。

早 G_1 期：为扭曲状的单股粗线状染色体，较短。

晚 G_1 期：为细长而着色浅的单股染色体，整个染色体部分呈线团状。

2. S 期 PCC

S期正在进行DNA复制，染色体高度解螺旋，DNA以多点进行复制，故复制区为光镜下不可见部分。尚未解螺旋复制或复制后凝集的染色质部分在光镜下可见为双线的染色体片段形式存在，染色较深，呈粉末状或粉碎颗粒化。

早S期：为染色浅的粉末状，其中散在着一些染色深的成双的染色体片段。

晚S期：染色深的双线染色体片段增多和延长。

3. G_2 期 PCC

G_2 期DNA复制已完成，形成的每条染色体由两条染色单体组成，随螺旋化的发展，逐渐增粗，变短。

早 G_2 期：为较细长的双线染色体。

晚 G_2 期：为较粗短的双线染色体，但仍比中期染色体细长，边缘光滑。

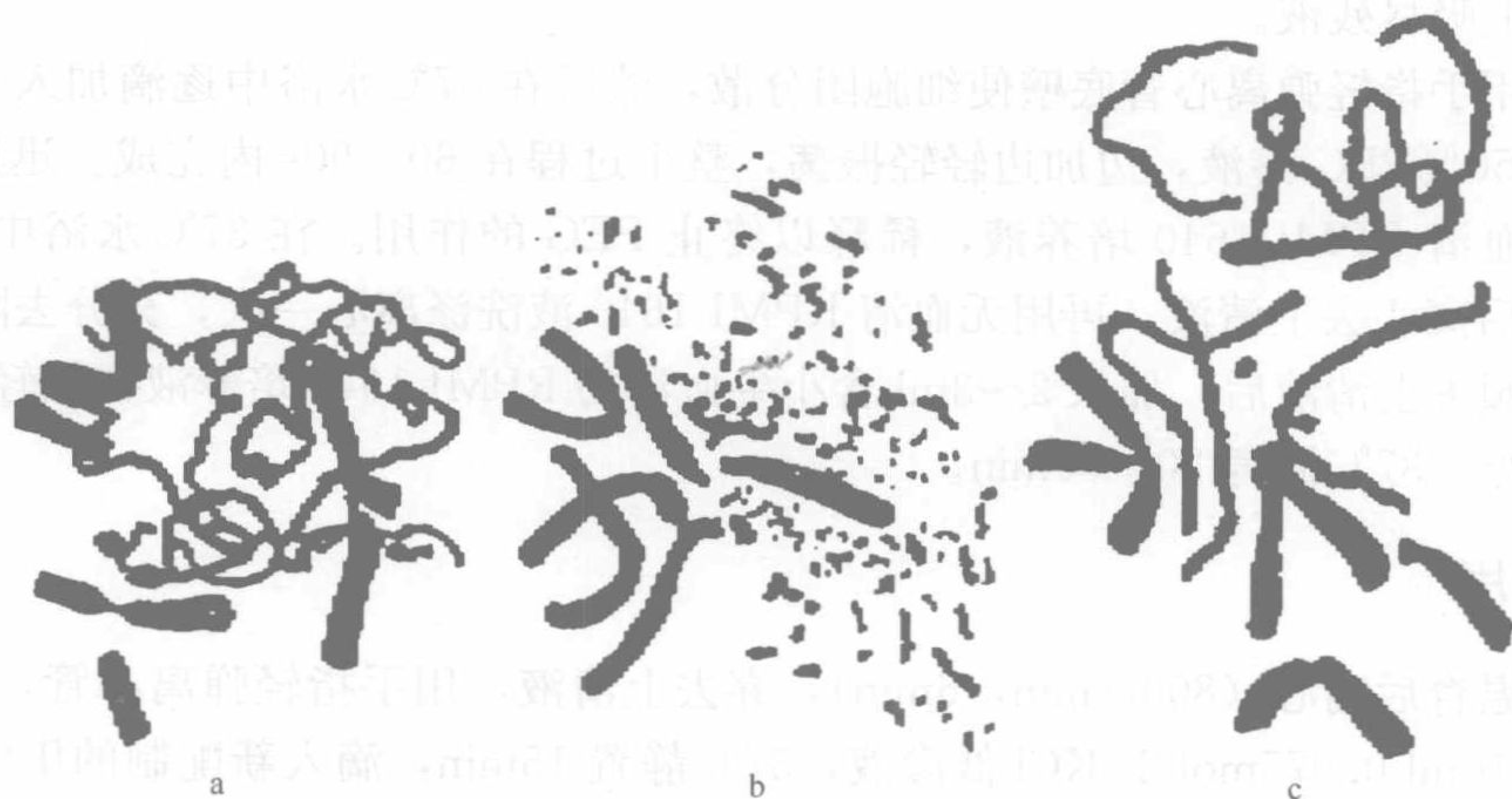


图 6-6　分裂期细胞与间期细胞融合诱导的PCC

a. M×G_1；b. M×S；c. M×G_2

以上现象反映了间期细胞中的染色质与分裂期细胞中的染色体是同一物质在细胞周期的不同阶段的两种不同表现形式。它们在结构上是连续的，动态变化着的。染色质由 G_1 期单线状结构，经S期复制进入 G_2 期形成双线状结构，到M期高度螺旋化凝集成典型的染色体，再平均分配到两个子细胞中去，进入到下一个周期中解螺旋又成为 G_1 期单线结构。

【注意事项】

（1）两种细胞混合后离心，上清液要小心地吸尽，否则会降低细胞融合率。用手指轻轻振动试管，将混合的细胞打散成浓的细胞悬液。

（2）滴加50%聚乙二醇时要缓慢地、一滴一滴地加入，每加一滴后立即用手指弹打试管壁，使其充分混合，然后加第二滴，直至加完。其目的在于提高细胞间的融合率。

（3）细胞加聚乙二醇60～90s后，迅速用RPMI 1640培养液稀释10倍，手法要轻。然后再在37℃条件下培养细胞30～60min，一般可获高比例的PCC。

（辛华）

6.2 细胞的分离

几乎所有的组织都是由多种不同类型的细胞组成的，为了详细研究某一种细胞的生化组成、生理特性及其功能，常需从组织中分离出某种单一类型的细胞进行研究。通常将组织先分离成单细胞悬液（suspension），然后再从细胞悬液中分离出不同类型的细胞。分离纯化细胞的方法有多种，可根据细胞的大小、形状、密度、黏附性、表面电荷或特殊成分的差别，采用不同的方法进行分离。常用的方法有：培养贴壁法、黏附法、差速离心法、密度梯度离心法、电泳法、亲和层析法，以及用流式细胞仪进行分离纯化。本节介绍两种常用且方便的细胞分离方法。

6.2.1 淋巴细胞的分离纯化

【实验原理】

外周血中淋巴细胞比重约为1.070，而红细胞和粒细胞的比重较大，为1.092左右。因此，利用相对密度为1.077±0.002的淋巴细胞分离液（称为分层液）离心，可使一定比重的细胞按相应密度梯度分布（使比重中较大的红细胞和粒细胞沉于管底，淋巴细胞浮于分层液与血浆的界面上），从而将淋巴细胞分离出来。

【实验用品】

（1）器材：水平离心机、血球计数板、无菌注射器、吸管、离心管等。

（2）试剂：市售淋巴细胞分离液、肝素、D-Hank's溶液（配方参见细胞培养一章）、RPMI 1640培养液。

（3）材料：人静脉血。

【方法与步骤】

（1）用肝素（无菌）湿润无菌注射器，抽取静脉血2ml，去掉针头，注入试管中，加入等量的Hank's溶液，混匀。

（2）取一支离心管加入2ml淋巴细胞分离液，将稀释血用吸管沿离心管壁慢慢加入铺在分层液表面，使血液与淋巴细胞分离液形成清晰的界面，稀释血与分层液体积大约2∶1，盖紧离心管胶盖。

（3）将离心管放入离心机，水平2000r/min离心20min，小心取出离心管，可见血

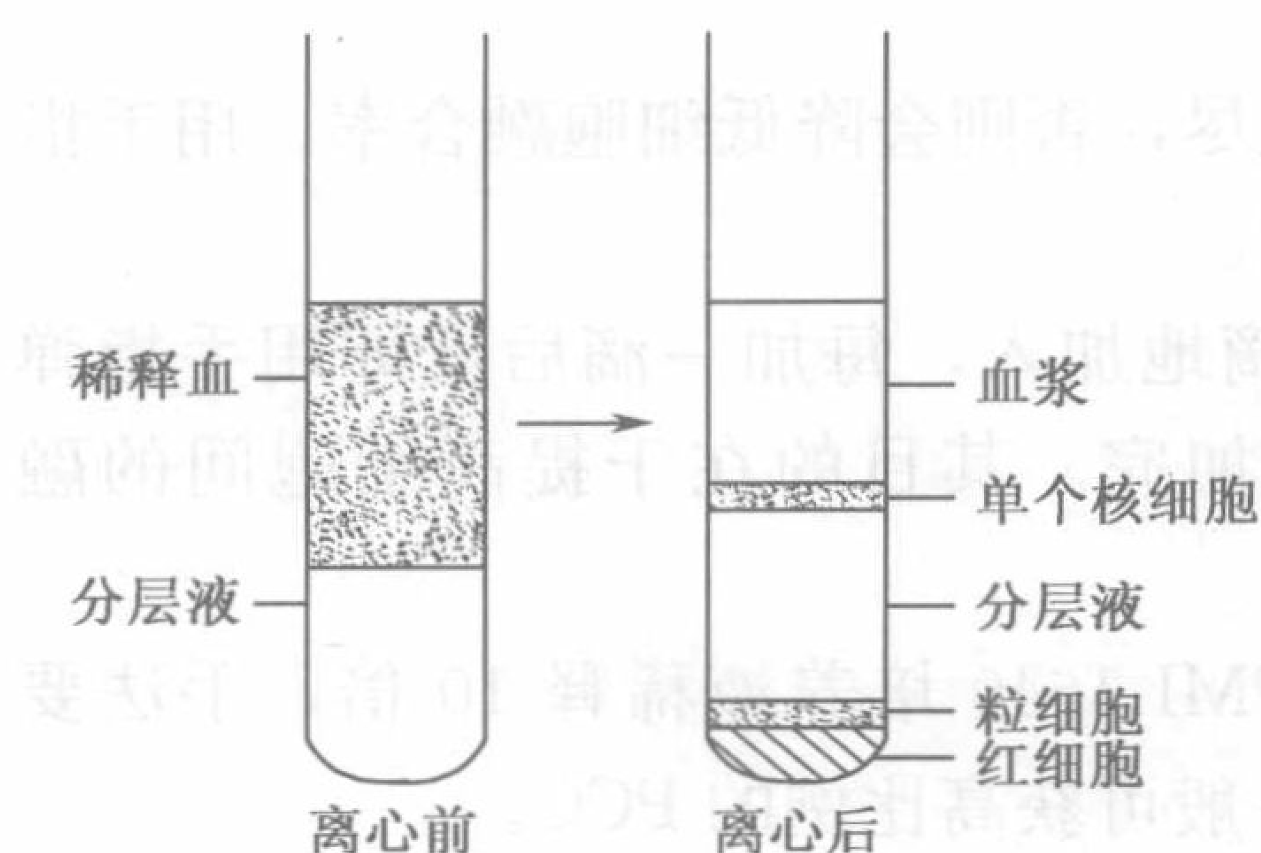


图 6-7　密度梯度离心前、后的细胞分布

液成分分层（图 6-7）。

（4）用平口吸管小心吸取中层白色雾状淋巴细胞层，移入另一离心管中。可以用无菌吸管吸出一滴液体涂片，干燥后用 Giemsa 染液染色，显微镜下观察。如果分离出来的细胞需要用来做其他实验，可以继续按以下步骤处理。

（5）加入 Hank's 溶液 3～4ml，用吸管吹匀，水平离心 1500r/min，10min，弃上清，再重复洗细胞一次，弃上清。

（6）加入 RPMI 1640 培养液 1ml 混匀，计数，并用台盼蓝检测细胞活力，最后用培养液配成所需浓度备用。

【观察与结果】

在高倍显微镜下观察 Giemsa 染色的细胞涂片，可以看到大量淋巴细胞，核大而圆，被染成蓝紫色，细胞质量少，染成浅蓝色。

【注意事项】

如果所分离的淋巴细胞要用于其他无菌条件的实验，所有步骤要按无菌操作方法进行。

（辛华）

6.2.2　死活细胞的分离

【实验原理】

由于死细胞在高磷酸盐介质中能够显著凝聚，故通过离心的方法能去除细胞悬液中存在的死亡细胞，达到分离死活细胞的目的。

【实验用品】

1. 器材

离心机、离心管、吸管、巴斯德吹管。

2. 试剂

KH_2PO_4（相对分子质量 136.1）、Na_2HPO_4（相对分子质量 142）、NaCl（相对分子质量 58.4）、高磷酸盐缓冲溶液（HPBS）、含 2%～5% FCS 的 HPBS（HPBS-FCS）、小牛血清（FCS）、蒸馏水。

1）高磷盐缓冲溶液（HPBS）

KH_2PO_4	4.0g
Na_2HPO_4	17.13g
NaCl	9.0g

将上述物质溶解在 1800ml 蒸馏水中。调 pH 到 7.4，加蒸馏水到 2000ml。

2）含 2%～5% FCS 的 HPBS（HPBS-FCS）

将 FCS 加入到 HPBS 中，使之成为含 2%～5% FCS 的 HPBS。4℃冰箱保存，用前调至室温。

3. 材料

细胞悬液。

【方法与步骤】

(1) 用含 2%～5% FCS 的 HPBS（HPBS-FCS）制备组织细胞悬液。

(2) 将细胞悬液 200*g* 离心 10min，去掉上清液。

(3) 用适量的 HPBS-FCS 悬浮沉淀；用巴斯德吸管吹打细胞悬液（避免气泡），可使活细胞的碎片和死细胞的聚集物分开；用适量 HPBS-FCS 重新悬浮沉淀。

(4) 50*g* 温和离心 10～12s 以沉淀聚集物，但要把活细胞留在悬浮液中。

(5) 吸出上清液，将其 200*g* 离心 10min 以沉淀活细胞。

(6) 分别将收集到的死、活细胞用适量的 HPBS-FCS 制成细胞悬液，用台盼蓝染色法鉴别死活细胞是否分离充分，若分离不充分，则重复步骤 3～5 次。

【实验结果】

制备出彻底分离的死、活细胞。

【注意事项】

(1) 如果步骤 3 混合不彻底，可能降低活细胞的产量。

(2) 步骤 4 离心时间和转速要严格控制，超时、过速离心，将会沉降下活细胞，从而导致产量下降。

（窦薇）

6.3　细胞器的分离

【实验原理】

为了详细研究细胞内某种细胞器的生化组成、生理特性及其功能，或制备某种生物大分子，常需要大量采集细胞的某些亚组分。利用各种物理方法如研磨（grinding）、超声振荡（ultrasonication）和低渗（hypotonic treatment）等将组织制成匀浆（homogenate），细胞中的各种亚组分即从细胞中释放出来。由于细胞内各种颗粒成分的大小、形状和密度不同，在同一离心场内的沉降速度也不相同。不同大小的生物颗粒可以利用不同的离心机分离。普通离心机（8000r/min）可分离直径大于 1μm 的生物颗粒；高速离心机（8000～25 000r/min）可分离直径为 0.1～10μm 的生物颗粒；超速离心机（25 000～80 000r/min）可分离直径为 3.2～100nm 的生物颗粒和生物大分子。为了限制和保持细胞亚组分内酶的生物活性，有的离心机还装有低温控制装置。

由于细胞内各种组分的大小、密度不同，可以采用不同介质或不同转速的离心法将其分离出来。一个球形颗粒的沉降速度除了取决于它的密度、半径及介质的黏度外，还与离心场有关。离心场的离心力常用重力加速度 *g*（9.8 m/s^2）的倍数来表示，而实际操作时人们习惯用 r/min（离心机转子每分钟旋转的圆周数）来掌握。两者的关系是离

心力

$$g=1.11\times10^{-5}n^2r$$

注：r 为离心机中轴到离心管远端的距离，n 为离心机每分钟的转速（r/min）

细胞器的分离常通过组织细胞匀浆、分级分离和分析三个步骤完成。

分级分离方法有两种：差速离心法和密度梯度离心法。差速离心法（differential centrifugation）是指由低速到高速逐级沉淀分离，使较大的颗粒先在较低转速中沉淀，再用较高的转速将原先悬浮于上清液中的较小颗粒分离沉淀下来，从而使各种亚细胞组分得以分离。但由于样品中各种大小和密度不同的颗粒在离心时是均匀分布于整个离心介质中的，故每级分离得到的第一次沉淀必然不是纯的最重的颗粒，需经反复悬浮和离心加以纯化。密度梯度离心法（density gradient centrifugation）是用密度具有梯度的介质来替换离心管中的密度均一的介质，使介质分为不同的层次，浓度低的在上层，浓度高的在底层。细胞匀浆加在最上层，随后离心。这样，不同大小、形态、密度的颗粒，就会以不同的速度向下移动，集中到不同的区域，可以分别收集。

【实验用品】

（1）器材：低温高速离心机、玻璃匀浆器、天平、显微镜、吸管、Eppendorf 管、离心管、冰块、冰盒、载玻片、盖玻片、小烧杯。

（2）试剂：生理盐水、0.25mol/L 蔗糖、0.34mol/L 蔗糖-0.5mmol/L Mg（Ac)$_2$、0.88mol/L 蔗糖-0.5mmol/L Mg（Ac)$_2$、95%乙醇、丙酮、RBS 液、甲基绿-哌咯宁染液、中性红-詹纳氏绿染液。

（3）材料：大白鼠。

【方法与步骤】

1. 细胞核的分离

（1）取材：将饥饿 24h 的大白鼠击昏，断颈放血处死。立即剪开腹部，迅速取出肝组织浸入预冷的生理盐水，洗去血污，用滤纸吸干。

（2）剪碎组织：每组称取约 1g，在小烧杯中剪碎，用少量预冷的 0.25mol/L 蔗糖液洗涤数次。

（3）匀浆：将烧杯中的悬浮肝组织倒入匀浆器中进行匀浆。匀浆过程要在冰浴中进行。

（4）过滤：匀浆完毕，用数层经少量蔗糖溶液湿润的尼龙网过滤组织匀浆，移入离心管中。

（5）离心：在低温离心机中进行。每次离心前一定要在天平上将两离心管配平。第一次以 600g 离心 10min。将其上清液移入 Eppendorf 管中，盖好盖子置于冰浴中，留待后面使用。沉淀用 10ml 预冷的 0.25mol/L 蔗糖溶液离心洗涤 2 次，每次 1000g，10min。

（6）纯化：将沉淀用 5 倍体积 0.34mol/L 蔗糖-0.5mmol/L Mg（Ac)$_2$ 混悬。用长针头注射器在混悬液下轻轻加入 4 倍体积 0.88mol/L 蔗糖-0.5mmol/L Mg（Ac)$_2$ 溶液。尽量使两种溶液明显分层。以 1500g 离心 15～20min。弃去上清液，沉淀即为经过纯化的细胞核，用 RBS 溶液悬浮，4℃保存。

（7）细胞核鉴定：将分离纯化的细胞核制成涂片，空气干燥。将干燥后的涂片浸入95%的乙醇固定5min，晾干，滴加甲基绿-哌咯宁染液染色20～30min，丙酮分色，蒸馏水漂洗，滤纸吸干水分，镜检。观察每个视野中所见完整细胞核数量及纯度。

2. 线粒体的分离

将分离细胞核时收集的上清液以10 000*g*离心10min。收集上清液，置冰浴待用。沉淀用预冷0.25mol/L的蔗糖溶液悬浮，10 000*g*离心10min，反复2次。

线粒体鉴定：在干净的载玻片中央滴加1～2滴中性红—詹纳氏绿染液，用牙签挑取沉淀物均匀涂片。盖上盖片，染色5min，镜检。被染成亮绿色的即为线粒体。

3. 溶酶体的分离

分离线粒体时的上清液以16 300*g*离心20min，上清液留待后用，沉淀加入10ml预冷的0.25mol/L蔗糖溶液悬浮，用同样的条件再离心1次。

溶酶体可用酸性磷酸酶显示法进行鉴定，方法可参见本书细胞化学部分。溶酶体的外形在光镜下不能看见，但可以看到棕黑色的颗粒和斑块。

4. 微粒体的分离

分离溶酶体的上清液经100 000*g*离心30min。上清液留待后用，沉淀即为由内质网碎片形成的微粒体。

5. 核蛋白体、病毒、生物大分子的分离

分离微粒体的上清液经150 000*g*左右的转速离心3h，可获得核蛋白体、病毒和生物大分子。

（李继胜）

参考文献

黄培堂. 2001. 细胞实验指南. 北京：科学出版社. 793～800
细胞融合仪（Multiporator 4308型）说明书. Eppendorf. AG. Germany
辛华. 2001. 细胞生物学实验. 北京：科学出版社. 127～139
薛庆善. 2001. 体外培养的原理与技术. 北京：科学出版社. 911～917

第7章　原位杂交技术

原位杂交（*in situ* hybridization，ISH）是将分子杂交和组织细胞化学结合而产生的一种较新的实验手段。细胞中的DNA或RNA与互补顺序的探针（probe）结合，通过探针上的标记物显示其在组织细胞中的位置分布。从1969年创立至今，原位杂交已充分显示出它的巨大威力，目前已成为研究各类组织或细胞内DNA或RNA定位的最有效的手段，对于研究基因的表达和修饰具有重要意义。原位杂交已经广泛地应用于多个领域，如基因定位及基因图谱绘制、病毒学、神经科学和内分泌学、病理学、免疫学、发育生物学及临床检验等，成为医学生物学工作者研究基因及其表达的一项有力工具。

应用于原位杂交的探针包括双链cDNA和单链cDNA探针、cRNA探针、合成的寡核苷酸探针等。探针与胞内的DNA或RNA杂交形成的杂交体包括三种形式：DNA-DNA、DNA-RNA和RNA-RNA。

探针的标记物可分为放射性同位素和非放射性物质两大类。

1）同位素标记

常用^{32}P-NTP通过各种酶促反应使之掺入到DNA或RNA探针上，杂交后通过放射自显影或液闪计数来显示结果。该方法灵敏度高，对基因或其表达可以进行定量研究；

2）非同位素标记

常用的非放射性标记物包括荧光素（fluorochrome）、生物素（biotin）、地高辛（digoxin）及一些酶类。利用非放射性物质作为标记物操作安全、设备简单、时间较短，稳定性和分辨率也较高。

利用荧光素标记的探针，可以直接在荧光显微镜下显示；利用酶类直接标记的探针，可以通过酶细胞化学方法显色；生物素与卵白素（avidin，又称抗生物素antibiotics）高度亲和，卵白素可以与易于检测的酶类结合，通过酶细胞化学方法显示探针的位置。生物素标记的探针应用简便，不足之处是细胞内往往含有内源性生物素，需先行封闭，否则将造成假阳性结果；地高辛（异羟基洋地黄毒苷）是从洋地黄类植物中分离出的一种类固醇类半抗原（hapten），探针中的地高辛可以与抗地高辛抗体结合，抗体上连接的酶可通过酶细胞化学方法显示，地高辛标记的原位杂交敏感性高，且无内源干扰，是一种较为理想的探针。

常见的与卵白素或抗地高辛抗体上连接的酶类包括：辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）和碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，AKP）。HRP若以DAB（四氢氯化二氨基联苯胺）/H_2O_2为底物，结果为棕色；若以4-氯-1-萘酚/H_2O_2为底物，结果为蓝色。AKP以BCIP（5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐，5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate）/NBT（硝基四氮唑蓝，nitro-blue tetrazolium）为底物，结果为蓝紫色。

进行原位杂交的对象可以是石蜡组织切片、冰冻组织切片、培养细胞和染色体等。本实验主要介绍利用地高辛标记的cRNA探针与培养细胞内mRNA杂交及显示方法。

7.1　地高辛标记的原位杂交

【实验原理】

细胞中基因表达出的mRNA与带有地高辛标记的互补顺序的cRNA探针杂交形成较稳定的杂交体复合物，探针上的地高辛再与连接碱性磷酸酶的抗地高辛抗体进行抗原-抗体反应结合。显色系统（BCIP/ NBT）中BCIP（5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐）的磷酸基团可被碱性磷酸酶水解，进而脱氢氧化缩合为蓝紫色的双分子聚合物，而NBT（硝基四氮唑蓝）则接受氢还原为蓝紫的双分子聚合体。结果在mRNA存在处即可看到蓝紫色沉淀。杂交及显色原理如图7-1所示。

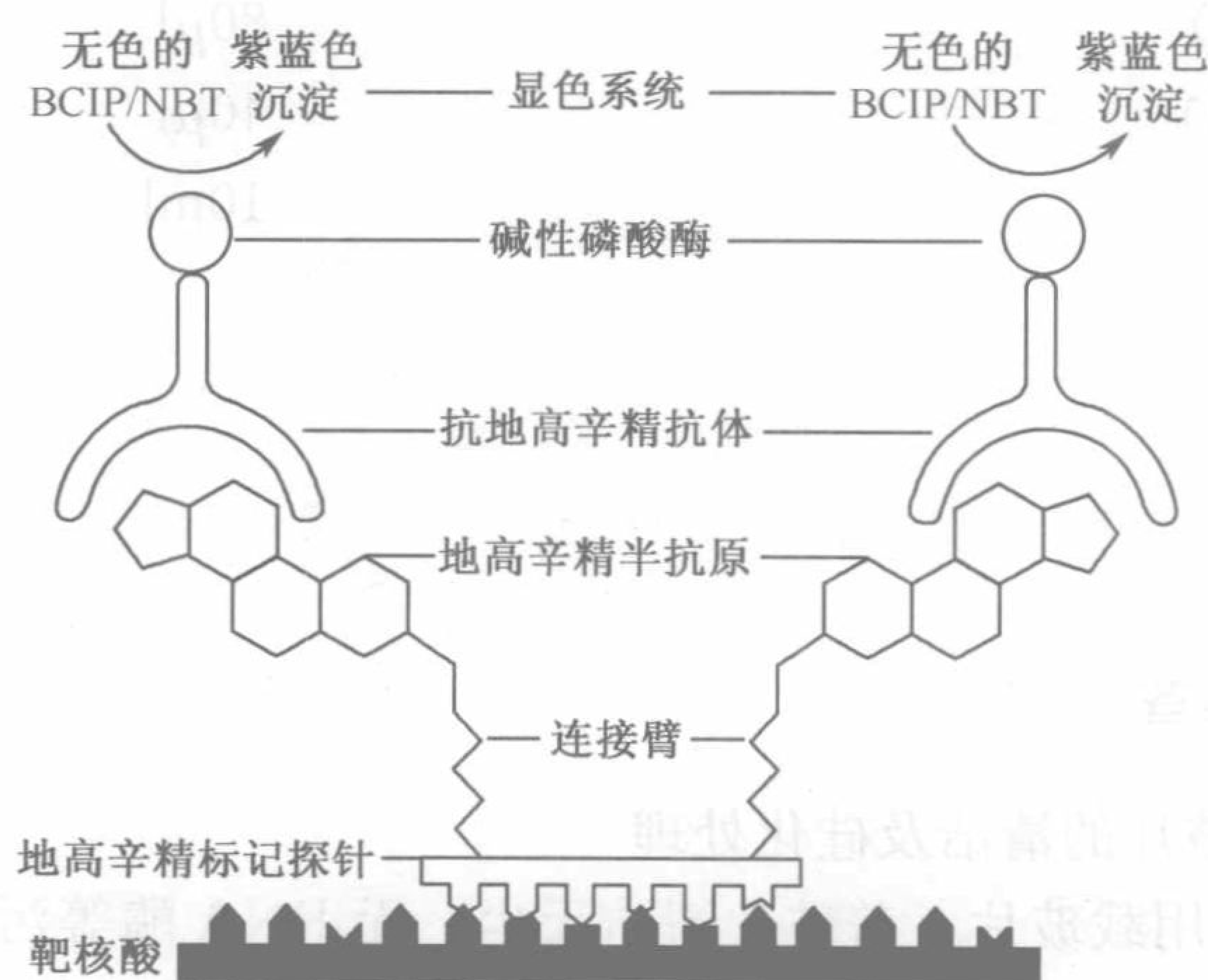


图 7-1　地高辛精-抗地高辛精系统检测原位杂交示意图

【实验用品】

1. 器材

温箱、湿盒、微量加样器。

2. 试剂

1）PBS

2）各级SSC溶液 4×SSC，2×SSC，1×SSC，0.5×SSC

20×SSC溶液（储存液）配制：NaCl 175.3g，柠檬酸三钠 88.2g，用双蒸水溶解，至近1000ml时，用1mol/L HCl调节pH为7.0，再加双蒸水至1000ml。其他各级SSC可由储存液加双蒸水稀释而得。

3）TSM1液（1000ml）

1mol/L	Tris-HCl（pH8.0）	100ml
5mol/L	NaCl	20ml
1mol/L	$MgCl_2$	10ml
双蒸水		870ml

4）TSM2 液（1000ml）

1mol/L Tris-HCl（pH9.5）	100ml
5mol/L NaCl	20ml
1mol/L $MgCl_2$	50ml
双蒸水	830ml

5）TSM3 液（1000ml）

1mol/L Tris-HCl（pH7.5）	20ml
1mol/L EDTA	5ml
双蒸水	975ml

6）显色液

NBT（50mg/ml）	80μl
BCIP（50mg/ml）	40μl
加 TSM2 至	10ml

3. 材料

培养细胞爬片。

【方法与步骤】

1. 实验用品的准备

1）载玻片、盖玻片的清洁及硅化处理

原位杂交要求所用载玻片、盖玻片清洁无尘，无 RNA 酶等污染物，最好经硅化处理且涂黏附剂。

（1）清洗：新购置的载玻片和盖玻片用热肥皂水浸泡十几分钟后刷洗，自来水清洗干净后，置于洗液中浸泡 24h，清水洗净烘干，再在 95%乙醇中浸泡 24h，蒸馏水冲洗，150℃烘烤 4h 以上。

（2）硅化处理：将清洗干净的玻片放在 2%（*V*/*V*）的用丙酮配制的 3-氨丙基三乙氧基硅烷（3-aminopropyltriethoxysilane，APE）液中浸泡 10s，丙酮液中浸洗 1min，用 0.1%焦碳酸二乙酯（diethyl pyrocarbonate，DEPC）水浸洗 1min，在 37℃的温箱中过夜干燥。

（3）黏片处理：使用前一周内进行。盖玻片浸入 500μl/ml 多聚赖氨酸（MW>150 000），取出，空气干燥后，储存于 4℃冰箱中。

2）杂交盒

由于原位杂交中所用杂交液少（10～20μl/片），温度较高（42～44℃），且整个过程较长（约 14h），为了保持标本湿润状态，杂交在特制的杂交盒（湿盒）中进行。

2. 实验步骤

1）标本制备

（1）细胞爬片培养法：在培养瓶中放置涂有黏附剂的盖玻片，进行原代培养或传代培养，使细胞稳定贴附于盖玻片上生长。

(2) 沉降细胞法：将细胞浓度调整为 2×10^7 个/ml，吸取 10μl 细胞悬液滴加于（涂有多聚赖氨酸）的玻片上，放入湿盒，静置 30min，使细胞沉降于玻片上。

制备好的标本浸入 4%多聚甲醛中，室温下固定 20min，浸入 3×PBS 溶液中 2min 以终止固定，再浸入 0.1mol/L PBS（pH7.2）中洗 2 次，每次 5min。

经固定处理的标本可直接应用，也可经以下程序处理后储存：标本经 50%、70%、95%、100%多级乙醇各 5min 脱水，完全干燥后，放入片盒，在－70℃条件下可放置几周，或在 70%乙醇溶液中 4℃保存。

2）杂交前处理

(1) 重回到水：

标本浸入 50%、30%乙醇溶液中各 3min，无菌双蒸水 3min×2 次，0.1mol/L PBS（pH7.2）5min×3 次，室温。

(2) 0.1mol/L 甘氨酸/Tris 缓冲液，pH7.4，10min，减少组织中游离醛基。

(3) 0.1mol/L PBS 3min×2 次（pH7.2）

RNA 酶处理阴性对照片制备：选 1～2 片标本片，加过量 RNA 酶（100μg/ml），置湿盒内（含 2×SSC），37℃，30min，完毕，2×SSC 冲洗 3min×2 次，PBS 冲洗。

(4) 细胞通透处理

方法 1：0.3～0.5% Triton X-100（PBS 配制）处理 20min，PBS 3min×2 次，以增加细胞的通透性。

方法 2：1μg/ml 蛋白酶 K（0.1mol/L Tris，50mmol/L EDTA 缓冲液，pH8.0，配制）处理 15～20min，暴露待测 mRNA。0.1mol/L 甘氨酸/PBS 洗 5min 以终止作用。

以上两种方法可单独或配合使用。

(5) 再固定

4%多聚甲醛/PBS 3min，PBS 漂洗 3min×2 次清除残留的固定液。

(6) 新配制的 0.25%乙酸酐（0.1mol/L 三乙酸胺配制）作用 10min，以封闭非特异性结合部位，降低非特异性反应。

(7) 2×SSC 漂洗 15min 准备杂交。

3）杂交

地高辛标记的 cRNA 探针，稀释至 0.5μg/ml 应用。每张标本片上加入探针 10～20μl，加盖硅化盖玻片，置于盛有 2×SSC 液的湿盒内，43℃过夜（14～18h）。

4）漂洗

(1) 4×SSC37℃15min；

(2) 2×SSC37℃15min；

(3) 2×SSC37℃30min（含 RNaseA，20μg/ml 湿盒，盖片）；

(4) 1×SSC37℃15min；

(5) 0.5×SSC37℃15min；

(6) 0.05mol/L PBS5min×3 次（室温）。

5）显色

(1) 擦干标本周围，向湿润标本上滴加抗地高辛抗血清（经 Anti-Dig 稀释液

TSM1 稀释至约1：500，可变动），室温，湿盒内作用4h。

（2）0.05mol/L PBS5min×4次

（3）TSM1 漂洗 5min，2次

（4）浸入 TSM2，5min，2次

（5）浸入作用底物 BCIP/NBT，室温下，遮光显色，一般显色 15min～1h 或更长，显色过程中定期镜检，观察蓝紫色生成程度。

（6）终止反应

浸入 0.05mol/L PBS5min×2。

（7）复染

可选择 1% 伊红、1% 苏木精、1% 亮绿或 5% 哌洛宁等染液复染 10～30 min，流水冲洗 5～10min 至水无色，也可不进行复染。

（8）封片

可趁玻片未干，用 PBS/甘油直接封片，也可经多级乙醇脱水，二甲苯透明后用加拿大树胶（Canada balsam）封片。

【实验结果】

在阳性标本中，在某些特定细胞的特定区域，有蓝紫色沉降生成。阴性对照中无此现象。

（李继胜）

7.2 放射性同位素标记的原位杂交

【实验原理】

原位杂交技术是将分子杂交和组织细胞化学结合而产生的一种较新的实验手段。细胞中的 DNA 或 RNA 与互补顺序的探针（probe）结合，通过探针上的标记物显示其在组织细胞中的位置分布。用于原位杂交的探针可以是单链或双链 DNA，也可以是 RNA 探针。探针的标记物可以是放射性同位素，也可以是非放射性生物素和半抗原等。放射性同位素中，^{3}H 和 ^{35}S 最为常用，^{3}H 标记的探针半衰期长，成像分辨率高，便于定位，缺点是能量低；^{35}S 标记探针活性较高，影像分辨率也较好，而 ^{32}P 能量过高，致使产生的影像模糊，不利于确定杂交位点。

【实验用品】

（1）仪器与用品：台式高速离心机、恒温水浴槽、烘烤箱等。

（2）试剂：PBS、细胞固定液、2×SSC、载玻片预处理液、RNA 标记探针杂交液等。

① PBS：100mmol/L Na_2HPO_4，20mmol/L KH_2PO_4，137mmol/L NaCl，27mmol/L KCl，pH 7.4。

②细胞固定液：4% 福尔马林，10%冰醋酸，1×PBS。

③2× SSC：300mmol/L NaCl，30mmol/L 柠檬酸钠，pH 7.0。

④载玻片预处理液：2×SSC，0.02%Ficoll400，0.02%聚乙烯吡咯烷酮（PVP）。

⑤RNA 标记探针杂交液：50%～70%去离子甲酰胺，2×SSC，0.5×Denhardt's

溶液，1mmol/L EDTA（pH 7.0），200μg/ml 变性鱼精 DNA。

（3）材料：哺乳动物培养细胞或动物的组织。

【方法与步骤】

1. RNA 探针的制备

1）制备 RNA 探针的 DNA 模板

2）RNA 探针的合成（probe synthesis）

购买同位素标记的相应探针或按以下方法合成。

（1）在无 RNA 酶的 1.5ml Eppendorf 管中依次加入：

1μl	T3 或 T7 或 SP6 RNA 聚合酶（Promega 公司）
1μl	10×转录缓冲液
1μl	DIG-U NTP 混合液（Roche-BMB 公司）
1μl	100mmol/L DTT
1μl	RNA 酶抑制剂（RNAsin，Promega 公司）
5μl	线性化 DNA（2.5g）

（2）放置 37℃水浴，2h。

（3）向管中加入 15 μl H_2O 及 25μl 2×碳酸钠缓冲液；放置 65℃水浴 20min。

（4）向管中加入：

50μl	终止液
15μl	4mol/L LiCl
5μl	20mg/ml 酵母 tRNA
300μl	冷 100%乙醇

（5）混匀，放置−20℃至少 20 min。

（6）4℃高速离心，15 min。

（7）弃上清，用 70%乙醇洗沉淀，再次离心。

（8）弃上清，晾干沉淀，加入 75μl 杂交液溶解沉淀。

（9）−20℃短期储存或−80℃长期储存。

2. 用于检测 RNA 的载玻片和盖玻片预处理

（1）载玻片处理：用 0.1mol/L HCl 洗载玻片 20min，再用无水乙醇洗数次使其干燥；在载玻片预处理溶液中，65℃处理 2h；固定在乙醇/乙酸（3∶1 *V/V*）20min，180℃烘烤 2h。

（2）盖玻片处理：于 0.1mol/L HCl 中浸泡 20min，用无水乙醇洗，干燥后用二甲基氯化硅硅化，180℃烤 2h。

3. 组织细胞固定

固定于 4%多聚甲醛（pH 7.0），在 4℃下放 60min 或放室温 10min，PBS 洗 5min。系列乙醇脱水干燥。

4. 原位杂交

(1) 用 2×SSC 和 50%福尔马林处理组织细胞 5min；

(2) 将 RNA 标记探针溶于杂交缓冲液中（5×10^7cpm/ml 放射强度），在 85℃孵育 5min；

(3) 每张载玻片上滴加杂交液，使每张载玻片探针总量为 2×10^5CPM，用一硅化的盖玻片盖住，封以不透性矿物油，在利于探针的温度下（常为 42℃）杂交 12～18h；

(4) 用氯仿洗数次，去除矿物油，室温下使盖玻片在 2×SSC 液中滑落，再滴加 50%～70%去离子甲酰胺，0.1×SSC 液，杂交温度下 60min；

(5) 室温下，用 2×SSC 洗 5min；

(6) 用 50μg/ml RNase A 在 2×SSC 中消化去除单链 RNA；

(7) 滴加 50%～70%去离子甲酰胺，0.1×SSC，室温 15min；

(8) 室温下用 0.1×SSC 洗 5min；

(9) 将切片脱水，曝光于 X 射线胶片 24～48h；

(10) 显影，拍照。

【观察与结果】

显影拍照后，用图像分析仪进行灰度分析。与对照组相比，在实验组胶片上可以清晰地观察到探针标记的不同梯度的灰度，反应相应目的 RNA 在组织细胞内的定位分布。

【注意事项】

(1) 标本组织蛋白质的消化程度对探针进入细胞极为重要，去除蛋白质的方法是用 0.2mol/L HCl 处理载玻片，蛋白酶 K 消化，然后用不同浓度的乙醇脱水。

(2) 为了防止探针的非特异贴附，保证细胞黏附，需处理载玻片和盖玻片。

(3) 理想的细胞固定过程应该保护细胞形态，同时确保目的基因 DNA 或 RNA 序列暴露。对于 RNA-RNA 原位杂交有效的固定剂是 4%多聚甲醛和磷酸缓冲液 PBS。

(4) 原位杂交与盐浓度、温度、甲酰胺浓度、pH 等有关，DNA 复性的温度是 16～32℃，DNA-RNA 原位杂交，25℃最佳，RNA-DNA 杂交，可用较高温度，在 pH 5～9 范围内复性率基本上与 pH 无关。最好选用温和的碱性条件。甲酰胺有机溶剂可降低双链核酸的稳定性，可避免杂交过程中处于过高的温度，防止高温破坏组织。

(5) 用不同浓度和不同温度的盐溶液洗涤是为了去除探针与不完全同源序列杂交，减少非特异性显色，其原则为盐浓度由高到低，温度由低到高洗涤，洗涤过程中切勿使切片干燥。

（朱长军　李炳生）

7.3　胚胎整体原位杂交

原位杂交是在分子生物学领域应用极为广泛的实验技术之一，其英文名为 *in situ* hybridization，其中 *in situ* 为拉丁文，原意是“in its natural position”。字面的意思

理解就是说在其原来的天然的位置处杂交。

原位杂交主要是基于以下主要原理：单链的 DNA 或者 RNA 只要它们的序列是互补的，即符合 AT，CG 的碱基配对原则，那么这样的两条核酸链之间（DNA-DNA，DNA-RNA，RNA-RNA）就可以形成一个稳定的杂交复合体。这一原理对于检测一个特异的 mRNA 在某一种生物体，或者某些组织切片、单个细胞里具体的表达位置非常有用。

原位杂交属于固相核酸分子杂交的范畴，但它区别于固相核酸分子杂交中的任何一种核酸分子杂交技术。Southern 印迹杂交法是用于鉴定 DNA 中某一特定的基因片段，而 Norhtern 印迹杂交法是用以检测某一特定的 RNA 片段的。它们都只能证明该病原体、细胞或组织中是否存在待测的核酸，而不能证明该核酸分子在细胞或组织中存在的部位。原位杂交技术则弥补了上述不足，同时非放射性标记物的发展使原位杂交组织化学技术成为实验室的常规技术和临床日常应用的诊断技术。

整体原位杂交技术，不同于一般的在载片上对细胞和组织切片进行探针杂交及检测的原位杂交，而是对完整的胚胎进行探针杂交及检测，从整体上把握探针的结合部位，然后对胚胎进行切片，以确定探针结合的具体位置。

【实验原理】

整体原位杂交技术是采用非同位素（如地高辛）标记的相关基因探针，对胚胎进行 RNA 原位杂交，通过检测胚胎组织中 mRNA 的存在状况来观察基因的表达。

用化学方法把类固醇类半抗原地高辛分子连接在 dUTP 上（Dig-dUTP），用随机引物及 RNA 多聚酶，以 DNA 为模板，合成地高辛标记的 RNA 探针，这样化学修饰过的 dUTP 就掺入到标记的 RNA 探针中。杂交后用碱性磷酸酶标记的抗地高辛单抗与标记探针 RNA 中的 Dig-dUTP 结合，加入显色底物，在碱性磷酸酶作用下，转变成深棕色或蓝色的化合物。

由于此技术可以从整体水平反映基因表达的全貌，因此在检测基因在细胞中的表达位点的研究中比其他方法，包括 Northern 杂交、同位素或非同位素标记的切片原位杂交等，在灵敏度和准确度上都有极大的提高，在生命科学的研究中可视为一项革命性的技术。该技术使得生命科学研究从器官、组织和细胞水平走向分子水平，为各个学科的研究带来突破性的进展，尤其是在细胞或组织的基因表达、染色体分析、病毒诊断和肿瘤学、传染病学、发育生物学等领域得到广泛应用，为基因表达研究提供了一种可与免疫组织化学相媲美的选择，是一种有效的研究胚胎中基因表达模式的方法。

【实验用品】

（1）器材：显微及成像系统（德国 Zeiss 公司）；酸度计、电子天平（德国 Sartorius）；摇床、水浴锅、超净台（丹麦 Heto-Holten 公司）；安全柜（德国 Heraeus 公司）；分光光度计、加样器、离心机、PCR 仪（德国 Eppendorf 公司）。

（2）试剂：PBS（美国 Gibco BRL 公司）；蛋白酶 K、肝素、酵母 RNA、RNA 酶 A、甘氨酸、吐温-20、甲醇、戊二醛和左旋咪唑等（美国 Sigma 公司）；过氧化氢和多聚甲醛（德国 Merck 公司）；Dig-RNA 标记试剂盒、抗地高辛配基抗体、碱性磷酸酶、

封闭剂和碱性磷酸酶底物等（瑞士 Roche 公司）。

①DEPC 水（经 DEPC 处理过的灭菌蒸馏水）：取市售 DEPC 1ml，加入 1L 待处理水（蒸馏水等）中，经猛烈振摇后，于室温静止数小时，然后高压灭菌，以除去降解的 DEPC（DEPC 分解为 CO_2 和乙醇）。

②1mol/L PBS（经 DEPC 处理，pH 7.2～7.4）：

NaCl	9g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	4g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0.4g

加入 1LDDW 中

③100% PTW 液：0.01 mol /L PBS（经 DEPC 处理），加上吐温-20 使其终浓度为 0.1%。

④20mg/ml 蛋白酶 K 溶液：称取 20mg 蛋白酶 K 溶于 1ml DEPC 处理过的灭菌双蒸水中，－20℃保存备用。

⑤10mol/L NaOH：200g NaOH 溶于 450ml 水中，混匀，再加水至 500ml。

⑥0.5mol/L EDTA（乙二胺四乙酸二钠盐）（pH8.0）：在烧杯中先加入 300ml 水，加入 93.5g EDTA-$Na_2 \cdot 2H_2O$，充分混匀，加 10mol/L NaOH 调 pH 至 8.0，加水至 500ml。

⑦20 × SSC：取 NaCl 175.3g；柠檬酸钠 88.2g；加水至 1000ml，用 10mol/L NaOH 调 pH 至 7.0；高压灭菌，室温保存。

⑧50mg/ml Torula RNA：称量 0.5g Torula RNA，加入 10ml DEPC 水，放入 70℃水浴，不断振荡，直到充分溶解为止。

⑨预杂交液（HYB－）：按甲酰胺溶液：20 × SSC 储液：DEPC 水＝2：1：1 配，加入吐温 20 使其终浓度为 0.1%，－20℃保存。

⑩杂交液（HYB＋）：均用无 RNA 酶的试剂配制。

50% Formamid	250ml
20×SSC	125ml
Torula RNA（50mg/ml）	10ml
Heparin（100mg/ml）	500μl
100×Denhart's	5ml
吐温-20	2500μl
CHAPS	0.5g
0.5mol/L EDTA	10ml

加 DEPC 水定容至 500ml

⑪1×MAB：0.1mol/L 马来酸（Sigma M0375），0.15mol/L NaCl 混合溶液，用 NaOH 调至 pH7.5，4℃保存。

⑫10%封闭液：10%封闭液（BMB）：1g 封闭剂（blocking reagent）粉末溶解于 10ml 1×MAB。

⑬染色缓冲液（APB）：

1mol/L Tris pH 7.5	100ml
1mol/L $MgCl_2$	50ml
2.5mol/L NaCl	40ml
吐温-20	5ml

加DEPC水定容至1000ml

⑭染色液：每毫升染色缓冲液＋ 2μl NBT ＋ 3.5μl BCIP。

⑮0.1mol/L 三乙醇胺：0.93g 三乙醇胺溶于 50ml DEPC 水中，用 10mol/L NaOH 调 pH 至 7.5 左右（现配）。

⑯4％ 多聚甲醛：称取 40g 多聚甲醛溶于装有 500ml DEPC 水的玻璃容器（烧杯或烧瓶）中，持续加热磁力搅拌至 60～65℃，使成乳白色悬液。用 1.0mol/L 的 NaOH 调 pH 至 7.0，使呈清亮状（滴加），再加入约 500ml 2×PBS，充分混匀（在冰浴或冷水浴中），可再检测一下 pH，过滤后定容至 1000ml，室温或 4℃保存备用。

⑰HEMFA：0.1mol/L HEPES，20mmol/L EGTA，10mmol/L 硫酸镁，4％多聚甲醛，pH7.4。

（3）材料：通过体外人工授精获得非洲爪蟾的受精卵。

【方法与步骤】

1. 地高辛探针的合成

用做整体原位杂交的地高辛探针采用体外转录的方法合成：含爪蟾全长 cDNA 的质粒经 *Bam*HⅠ酶切成链状作为模板，在一个有地高辛标记的 11-UTP 的体外转录系统中以 T3 RNA 聚合酶（Promega）催化合成反义 RNA。该质粒经 *Hin*dⅢ酶切后，SP6 RNA 聚合酶（Promega）可催化合成正义 RNA，用该正义 RNA 作为对照，以检查原位杂交系统的可靠性。每一个 20μl 的转录体系中含有以下成分：1μg 模板 DNA，2μl 地高辛 RNA 标记混合物（Bohringer mannheim，BM），20U RNA 酶抑制剂（Promega），20U T3 RNA 聚合酶或 SP6 RNA 聚合酶和 1 ×转录缓冲液，反应在 37 ℃进行 2 h。正义 RNA 和反义 RNA 经乙醇沉淀，溶于 20μl 的 DEPC 水后存放于－70 ℃冰箱中。

2. 原位杂交

非洲爪蟾胚胎放置于－20 ℃的 100％乙醇中备用，以下操作除最后的显色过程外，都在一个水平方向转动的摇床上进行。

1）原位杂交第一天

（1）胚胎固定和脱水处理：胚胎从－20 ℃乙醇中取出后，放在一个 5ml 带螺盖的塑料瓶中。再在室温下通过 100％、75％和 50％的乙醇各洗 1 次，每次 5min，然后以 25％乙醇＋75％ PTW 混合液洗 1 次，每次 5min，最后以 100％ PTW 洗 4 次，每次 5min。

（2）蛋白酶 K 处理：用 10μg/ml 的蛋白酶 K / PTW 在室温下消化 20min。

（3）酸化：

①在室温下加入 4ml 0.1mol/L 三乙醇胺（pH7.5）洗 2 次，每次放置 5min；

②在室温下加入 4ml 0.1mol/L 三乙醇胺（pH7.5）+10μl acetanhydride，洗 1 次，每次放置 5min；

③在室温下加入 4ml 0.1mol/L 三乙醇胺（pH7.5）+20μl acetanhydride，洗 1 次，每次放置 5min。

（4）再固定：4%多聚甲醛的 PTW 溶液在室温下再固定 20min。用 100%PTW 将多聚甲醛固定液洗净（5 次，每次 5 min）。

（5）预杂交和杂交：

①预杂交：每小瓶留 250μl 100%PTW，再加入 250μl 杂交液，混匀。然后立即去除瓶中的混合液，加入 1ml 杂交液，65 ℃温浴 10min。然后去除瓶中的杂交液，换上 1ml 杂交液，于 60 ℃ 预杂交 6h；

②杂交：去除预杂交的杂交液，再在 1μg/ml 地高辛标记探针的杂交液中 60 ℃杂交过夜。

2）原位杂交第二天

（1）将探针回收，放于－20℃保存，然后通过以下步骤将未结合的探针洗净：

①杂交液 60 ℃，洗 1 次，每次 10min，3ml；

②2 ×SSC 60 ℃，洗 3 次，每次 20min；

③20μg/ml RNAseA 在 2 ×SSC 37 ℃，作用 1h；

④2 ×SSC 在室温下放置 10min；

⑤0.2 ×SSC，60 ℃，洗 2 次，每次 30min；

⑥在室温下用 1×MAB，洗 2 次，每次 15min。

（2）抗体的温育

①在室温下加 0.8ml 5×MAB +0.8ml 10%BMB+2.4ml 水，作用 30min；

②在室温下加 0.8ml 的 5×MAB +0.8ml 的 10%BMB+0.8ml 的 100%羊血清+1.6ml 水，封闭处理 60min；

③在室温下按 1∶2500 的比例在 0.6ml 的 5×MAB+0.6ml 的 10%BMB+0.6ml 的 100%羊血清加上酶联地高辛抗体 1.2μl，胚胎吸收 4h；

④用 1×MAB 溶液将多余的抗体洗净，洗 2 次，每次 30min；

⑤然后加入 1×MAB 溶液，4℃ 冰箱过夜。

3）原位杂交第三天

（1）显色反应

①用 1×MAB 溶液，洗 2 次，每次 25min，再用 1×MAB 溶液处理 1h；

②然后在染色缓冲液（APB）中洗 2 次，每次 5min；

③将胚胎转入 24 孔板中，在染色液中于室温下显色：先在摇床上摇 30min，然后于暗处放置。每隔一小时观察胚胎是否开始显色。

（2）脱色：当出现理想的信号背景比时，将显色完全的胚胎中的底物吸出，用 100%甲醇洗2～3 次，每次 5min，以终止显色反应，并将浮色洗去。

（3）漂白：甲醇∶过氧化氢（7∶3）混合液处理 3～4d，从而将胚胎本身固有的色素去掉，以免干扰观察。

（4）固定：加上 HEMFA 溶液固定，拍照，4℃冰箱保存。

【观察与结果】

直接在显微镜下观察完整的整体原位杂交处理过的胚胎可以观察到以下情况（图 7-2）：在该原位杂交系统中，*Xsynuclein* 基因最初在尾芽（tailbud）期胚胎中表达（图 7-2，e）。在尾芽早期胚胎开始探测到杂交信号（图 7-2，e 箭头所示），不是所有的尾芽期细胞都表达这种蛋白基因，表达的区域集中在头部，其他区域表达量很少甚至完全没有该基因的表达（图 7-2，e 箭头所示）。从尾芽晚期胚胎一直到蝌蚪（tadpole）期杂交信号不断增强，集中于神经中枢，并维持较强的水平（图 7-2，h，i，k）。

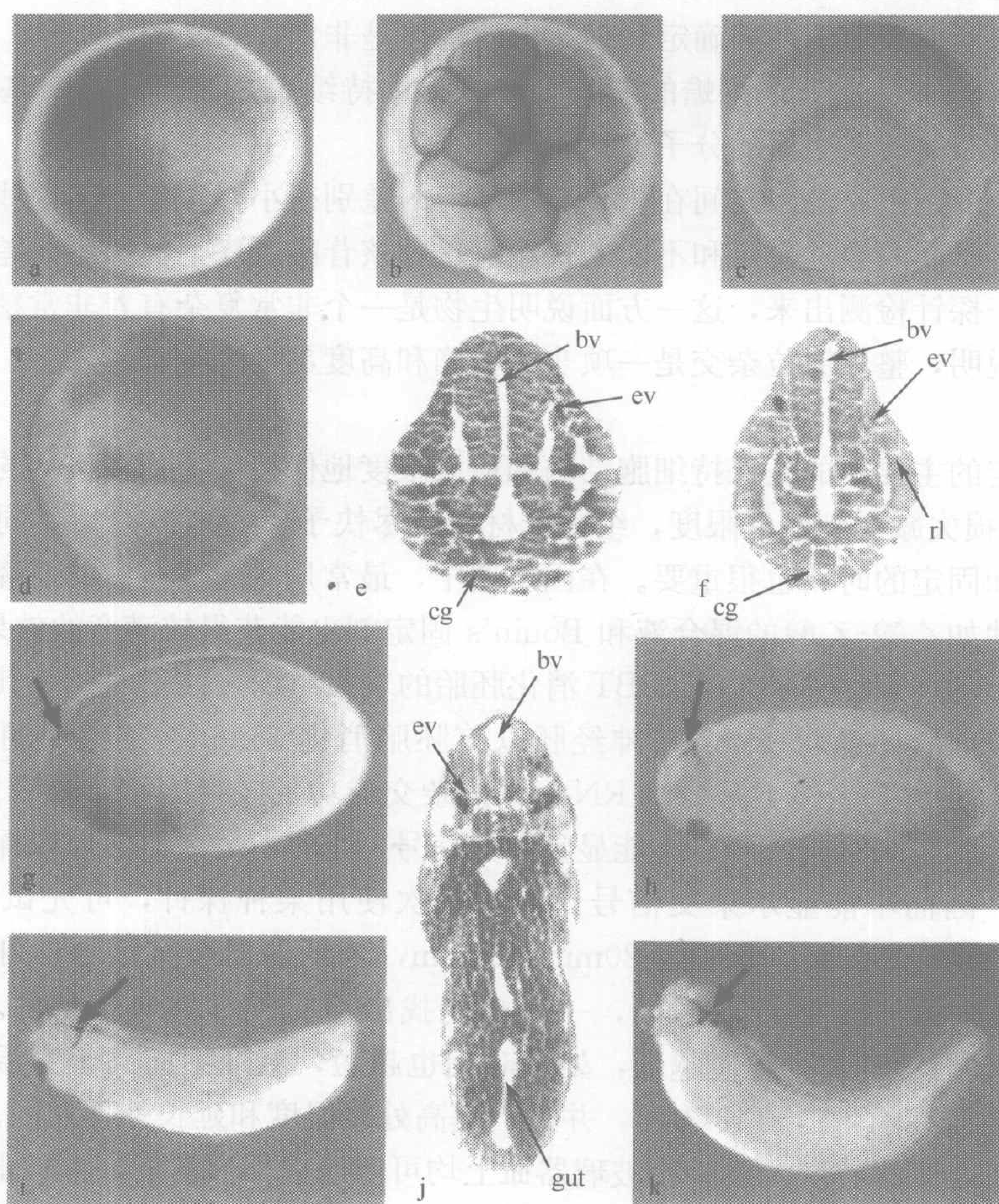


图 7-2　通过对非洲爪蟾的各个时期的胚胎用 *Xsynuclein* 的 RNA 探针进行整体原位杂交

在尾芽期之前的胚胎探测不到杂交信号（a，b，c 和 d）；在尾芽早期胚胎的神经中枢中开始探测到微弱的杂交信号（e，g）；从尾芽晚期胚胎一直到蝌蚪期杂交信号不断增强，并一直维持较强的水平（h，i，k）；e 和 g，f 和 h，j 和 i 分别是非洲爪蟾胚胎的 22 期，26 期和 33 期；e、f 和 j 是非洲爪蟾胚胎的横向组织切片；bv，brain ventricle 脑室；cg，cement gland 黏腺；ev，eye vesicle 眼泡；rl，retinal layer 视网膜

组织切片表明杂交信号一直集中于神经中枢的端脑中（图 7-2，e，f，j，箭头所示）。胚胎处于尾芽早期时，*Xsynuclein* 基因的表达集中在胚胎的头部（图 7-2，e 箭头所示）。随着胚胎进一步发育，这时该蛋白基因的表达始终集中在神经系统（图 7-2，f 箭头所示）。当胚胎进入蝌蚪期之后（如 40 期），胚胎的各种结构逐渐形成，该基因在头部的表达非常强的集中在端脑的眼泡，在其他部位几乎没有该基因的表达（图 7-2，j，箭头所示）。以正义 RNA 为探针作为对照，采用完全相同的步骤进行原位杂交时，在任何时期的胚胎中均无杂交信号。

该基因最初表达于尾芽早期的胚胎中，并局限在特定的区域（图 7-2 中的 e、g 所示），这些表达的区域应该与随后的神经发生有关。随着发育的进行，该基因不改变它的表达位点，一直集中在头部，这说明 *Xsynuclein* 基因是非洲爪蟾的神经系统特异表达的基因，随着神经系统的形成而逐渐集中于神经系统，最后集中于端脑，这种随着发育的进行蛋白基因表达位点的确定和表达量的增强是非常有意义的。

由于 *Xsynuclein* 在非洲爪蟾的端脑成熟过程中持续表达，因此这一基因有可能用做非洲爪蟾胚胎的神经中枢的分子标记。

不同类型的蛋白质基因之间在核苷酸顺序上的差别很小，正是由于这些很小的差别使得它们具有不同的表达位点和不同的功能。这种核苷酸顺序上的微小的差异可被原位杂交中地高辛探针检测出来，这一方面说明生物是一个非常复杂有着非常精细结构的有机体，同时说明，整体原位杂交是一项非常精确和高度灵敏的技术。

【注意事项】

（1）固定的主要目的是保持细胞结构和最大限度地保持细胞内 RNA 的水平。要使 RNA 的降解损失减少到最低限度，组织取材后应尽快予以冷冻或固定，同时固定剂的种类、浓度和固定的时间也很重要。在固定剂中，最常用的是 4%多聚甲醛，是理想的固定剂，其他如乙酸-乙醇的混合液和 Bouin's 固定剂也能获得较满意的效果。

（2）用 10μg/ml 的蛋白酶 K/PBT 消化胚胎的表面组织，便于探针和其他成分进入组织。囊胚以前胚胎消化 10min，神经胚以前胚胎消化 15min，其他晚期胚胎 20min。蛋白酶 K 处理条件是否适当是胚胎 RNA 原位杂交成功的关键因素。蛋白酶 K 处理过度，会导致胚胎组织结构破坏，不能显示杂交信号；处理不足，则会导致探针不能有效渗透至组织，因而不能显示杂交信号。对于初次使用某种探针，可先试用 1μg/ml～10μg/ml，室温下 10min、15min、20min、25min，若不出现杂交信号，可增加蛋白酶 K 浓度至两倍，再试上述各种时间，一般总能找出不同探针的最佳条件。一般而言，胚胎越小，蛋白酶 K 的浓度应越低，处理时间也越短，温度不应高于室温。若胚胎较大，则应使用较高的蛋白酶 K 浓度，并适当提高处理温度和延长处理时间。

（3）由于在手指皮肤及实验用玻璃器皿上均可能含有 RNA 酶，为防止其污染影响实验结果，在整个杂交前处理过程都需戴消毒手套。所有实验用玻璃器皿及镊子都应于实验前一日置高温（240 ℃）烘烤以达到消除 RNA 酶的目的。最好在消毒的玻璃器皿外包以锡箔纸以利于标记和防止取出时空气污染。杂交前及杂交时所应用的溶液均需经高压消毒处理，所用溶液要求以 DEPC（RNA 酶灭活剂）水配置。在杂交之前所使用的所有试剂和试管必须不含 RNase A，否则 RNA 探针或胚胎内 mRNA 将会被降解而得不到杂交信号。因此所有在杂交前和杂交中使用的器械、容器、移液管、枪头等，均

须用 DEPC（Sigma）处理并高压。杂交后使用的器材经高压除菌即可。

（4）在 RNA 原位杂交实验中，RNA 探针的长度与实验的成功与否密切相关。如果探针太长，则探针的通透性差，难于接近细胞内 mRNA 靶分子；探针太短则可产生高背景。两者都可致杂交信号减弱。普遍认为，用于 RNA 原位杂交的 RNA 探针长度应在 50～500nt。对于较长的探针，标记后通常应采用碱裂解法使探针水解至适宜长度，才用于杂交。但是，我们发现，即使是长达 1400nt 的 RNA 探针，在不经过碱裂解处理时用于杂交也能获得非常清晰的杂交信号，甚至比 200～650nt 长的探针更好。

（5）我们通过控制蛋白酶 K 消化时间、探针和地高辛抗体浓度，以及洗涤、显色过程，得到了低本底、着色清晰的杂交结果，结合图像的数据分析步骤，消除假阳性结果。建立了一套实用的胚胎整体原位杂交方法。

（刘瑶）

参考文献

李书鸿，郭绍东，孙方臻．1998．用整体原位杂交法研究微管蛋白基因在斑马鱼胚胎中的表达．科学通报，43(17)：1855～1858

吴燕，马子敏，刘淑红等．2004．小鼠胚胎整体原位杂交实用技术的建立．解剖学报，35(4)：461～463

Brady M A W, Finlan M F. 1990. Radioactive labels: autoradiography and choice of emulsions for *in situ* hybridization. In: Polak J M, McGee JO'D. *In situ* Hybridization: Principle and Practice. Oxford: Oxford University Press

Butler K, Zorn A M, Gurdon J B et al. 2001. Nonradioactive *in situ* hybridization to *Xenopus* tissue sections. Methods, 23(4): 303～312

Cao Y, Zhao H, Hollemann T et al. 2001. Tissue-specific expression of an ODC paralogue, XODC2, *in Xenopus laevis*. Mech Dev, 102: 243～246

Nieuwkoop P D, Faber J. 1975. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). 2ed. Amsterdam, Netherlands: North Holland Publ. Co

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1998. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press

第8章　细胞化学成分的分离与测定

细胞是由蛋白质和核酸为主要功能成分组成的生命复合体系，因此蛋白质和核酸是分子细胞生物学主要研究的对象。当对其中某一成分进行研究时，首先要对它们进行分离和纯化。分离的手段和方法主要根据它们的理化特性不同，采用不同的方法进行分离。本节将介绍常用的一些蛋白质和核酸的分离与测定方法。

8.1　蛋白质SDS-PAGE凝胶电泳

【实验原理】

聚丙烯酰胺凝胶（PAGE）是一种人工合成的凝胶，是由丙烯酰胺（Acr）和交联剂甲叉双丙烯酰胺（Bis）通过化学聚合而形成的一种具有三维结构的网状高聚物，其具有的分子筛效应，可用于蛋白质和核酸等生物大分子的分离。聚合反应需要催化剂过硫酸铵［$(NH_4)_2SO_4$］，为加速聚合，在制备凝胶时还需 *N*，*N*，*N*，*N*-四甲基乙胺（TEMED）作为催化剂。蛋白质在PAGE中的迁移速率取决于它所带的净电荷、分子大小及空间构象，但在SDS-PAGE体系中，SDS以其轻链与蛋白质分子的侧链结合形成复合物，在一定条件下SDS与蛋白质的结合比为1.4g SDS：1g蛋白质，相当于每两个氨基酸残基结合一个SDS分子，由于SDS为阴离子，使多肽链覆盖相同密度的负电荷，该电荷量远超过蛋白质本身的电荷量，因此掩盖了不同种类蛋白质分子原有的电荷差别。同时蛋白质的形态变成长椭圆棒状，短轴长度趋于一致，而长轴长度与蛋白质的分子质量大小成正比，因此不同的蛋白质的SDS-复合物都具有相同的荷质比，并具有相似的构象，蛋白质在凝胶中的迁移速率只与蛋白质的分子质量呈线性关系。蛋白质电泳后可用考马斯亮蓝、银染或免疫印迹分析。

【实验用品】

（1）器材：垂直电泳槽、边条、梳子、电泳玻璃板、琼脂糖、注射器、稳压直流电源、微量移液器、吸头、电炉等。

（2）试剂：聚丙烯酰胺母液（30%）、Tris-HCl缓冲液（1mol/L，pH6.8）、Tris-HCl缓冲液（1.5mol/L，pH8.8）、10% SDS、10%过硫酸铵、TEMED 、蛋白质分子质量标准参照物、成层胶（5%）、分离胶（8%）、分离胶（12%）、考马斯亮蓝染液、脱色液、电泳缓冲液（pH8.3）、样品缓冲液（3×储备液）等。

（3）材料：哺乳动物培养细胞或动物的心肌组织匀浆液。

【方法与步骤】

（1）备玻璃板，安装电泳槽；

（2）灌制8%或12%分离胶；在分离胶上面加入约5ml覆盖物（0.1%SDS或正丁醇）；

（3）凝胶聚合后，倒掉SDS，用去离子水冲洗凝胶上部数次，用吸水纸吸干凝胶顶

端残存的液体；

(4) 配制 5%成层胶；

(5) 将成层胶注入分离胶上部，插入梳子；

(6) 在成层胶聚合的同时，将样品与样品缓冲液混合，100℃加热 5min；

(7) 成层胶聚合完成后，将电泳缓冲液倒入电泳槽中，拔出梳子，上样前用电泳缓冲液冲洗梳孔；

(8) 将蛋白质分子质量标准和待测样品（50μg）按次序上样；

(9) 电泳：开始时电压为 100V/cm，染料进入分离胶后，将电压增至 200V/cm，继续电泳直到染料抵达分离胶底部，断开电源；

(10) 将凝胶取下，放入考马斯亮蓝染液中浸泡，室温下振荡 1～2h 染色；

(11) 换掉染色液，用脱色液浸泡凝胶，室温下振荡 4～8h 脱色，其间换 3～4 次脱色液，继续使凝胶脱色直到满意为止；

(12) 将脱色后的凝胶拍照。

【观察与结果】

在 SDS-PAGE 胶上可看到多条蓝色清晰的蛋白质条带。

【试剂配方】

(1) 成层胶（5%）：30%丙烯酰胺溶液 1.3ml，1.0mol/L Tris（pH6.8）1.0ml，0.1%SDS；10%SDS 0.08ml，10%过硫酸铵溶液 0.08ml，TEMED 0.008ml，水 5.5ml，总体积为 8ml；

(2) 分离胶（8%）：30%丙烯酰胺溶液 4.0ml，1.5mol/L Tris（pH8.8）3.8ml，10%SDS 0.15ml，10%过硫酸铵溶液 0.15ml，TEMED 0.009ml，水 6.9ml，总体积为 15ml；

(3) 分离胶（12%）：30%丙烯酰胺溶液 6.0ml，1.5mol/L Tris（pH8.8）3.8ml，10%SDS 0.15ml，10%过硫酸铵溶液 0.15ml，TEMED 0.006ml，水 4.9ml，总体积为 15ml；

(4) 考马斯亮蓝染液：0.1g 考马斯亮蓝 R250，50ml 甲醇，10ml 冰乙酸，加去离子水至 100ml，混匀，滤纸过滤后备用；

(5) 脱色液：5ml 甲醇，7.5ml 冰乙酸，加去离子水至 100ml；

(6) 电泳缓冲液（pH8.3）：250mmol/L 甘氨酸，0.1%SDS；

(7) 样品缓冲液（3×储备液）：1mol/L Tris-HCl（pH6.8）1.5ml，SDS 0.6g，溴酚蓝 30mg，甘油 3ml，加水定容至 10ml。用前取 1ml 加 9μl β-巯基丙醇，与样品按体积 1∶2 混合，100℃煮沸 5min。

（卞继峰）

8.2　真核细胞基因组 DNA 的提取

【实验原理】

真核细胞基因组 DNA 位于细胞核内，与细胞核蛋白质结合在一起。真核细胞基因

组 DNA 提取的主要步骤无外乎破碎细胞，去除与核酸结合的蛋白质、多糖、脂类以及其他不需要的核酸（RNA）等生物大分子。细胞破碎的手段常为超声波、组织匀浆、液氮研磨及包埋组织的超薄切片等方法。为了获得大分子质量的完整的 DNA，一般采用蛋白酶 K 和去垢剂 SDS 等温和的方法破碎细胞。细胞基因组 DNA 的提取是多种分子生物学和细胞生物学研究的重要步骤。

【实验用品】

（1）仪器与器材：组织捣碎器或组织匀浆器、微量移液器、吸头、微量离心管、高速低温离心机、液氮罐、玻璃移液管、冰盒等。

（2）试剂：液氮、冰冷的 PBS、25∶24∶1 酚/氯仿/异戊醇、7.5mol/L 乙酸铵、70％及 100％乙醇、TE 缓冲液（pH8.0）、消化液。

消化液：100mmol/L NaCl，10mmol/L Tris-HCl，pH8.0，25mmol/L EDTA，0.5％SDS，0.1mg/ml 蛋白酶 K。

（3）材料：哺乳动物培养细胞或动物组织块。

【方法与步骤】

（1）剪取组织块，迅速剪碎，置于液氮中；

（2）用冰冷的组织捣碎器捣碎 200mg～1g 组织，每 100mg 组织加入 1.2ml 消化液；

（3）将悬浮细胞收集，500×g 离心 5min，或贴壁细胞用胰酶消化后收集离心；

（4）将培养细胞中加入 1～10ml 冰冷的 PBS，500×g 离心 5min，弃上清，重复一次，用 1 倍体积的消化液悬浮细胞；

（5）如细胞数少于 3×10^7，则加入消化液 0.3ml；如细胞数较大，则每 10^8 个细胞加入 1ml 消化液；

（6）将细胞移入带盖的离心管中，50℃消化 12～18h；

（7）加入等体积的酚/氯仿/异戊醇，混匀，1700×g 离心 10min。将上层液体移入一个新的离心管中。如果离心后分层不明显，可再重复消化和离心；如果在离心后的交界面有一白色薄膜，再重复酚/氯仿/异戊醇抽提；

（8）在上清液中加入 1/2 体积的 7.5mol/L 乙酸氨，2 倍体积的 100％乙醇，12 000×g 离心。为防止大分子质量基因组 DNA 的剪切，加入 100 倍体积的 TE 缓冲液反应 24h 以上，以除去有机溶剂和盐。

（9）用 70％的乙醇洗涤，晾干，溶于适量的 TE 中，DNA 终浓度为 1mg/ml；

（10）加入 0.1％SDS 和 1μg/ml 不含 DNase 的 RNase，37℃孵育 1h，重复步骤 6、7。一般 1g 细胞可得 2mg 基因组 DNA。

【观察与结果】

琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色显示在加样孔附近有荧光染色的 DNA 条带。

【注意事项】

在 DNA 提取过程中应注意避免剧烈的振荡，以保证提取基因组 DNA 的完整性。

（卞继峰）

8.3　真核细胞 RNA 的提取

【实验原理】

细胞中的 RNA 有以下几类分子组成，rRNA（占细胞总 RNA 的 80%～85%）、tRNA 和核内小分子 RNA（约占 10%～15%）、mRNA（占 1%～5%）。其中 mRNA 是分子生物学主要的研究对象。RNA 提取工作要求极为严格，对研究基因的转录调控、基因的克隆和表达、cDNA 文库的构建具有重要作用。

从细胞中分离的 RNA 的质量至关重要，包括 RNA 的纯度和完整性。RNA 分离的最关键因素是尽量减少 RNA 酶的污染。但 RNA 酶活性非常稳定，分布广泛，除细胞内源性的 RNA 酶外，环境中也存在 RNA 酶。因此在提取 RNA 时，应尽量创造一个无 RNA 酶的环境，包括去除外源性 RNA 酶的污染和抑制内源性 RNA 酶的活性。主要采用 RNA 酶的阻抑蛋白 RNasin 和强力的蛋白质变形剂盐酸胍或异硫氰酸胍抑制内源性 RNA 酶，焦碳酸二乙酯（DEPC）去除外源性 RNA 酶，主要步骤为将细胞或组织进行匀浆。目前用已知的最强的 RNA 酶抑制剂——异硫氰酸胍、十二烷基肌氨酸钠、巯基乙醇联合抑制 RNA 酶，并使核蛋白复合物解离，使 RNA 易于进入无 DNA 的水相，容易被异丙醇浓缩。提取的 RNA 可以用于核酸杂交、cDNA 合成以及体外翻译。

【实验用品】

1. 仪器与用品

组织匀浆机、玻璃移液管、微量移液器、吸头、微量离心管、高速低温离心机等。

2. 试剂

Trizol 试剂（Promega 公司）、异丙醇、75%乙醇、DEPC-水、37%甲醛、甲酰胺、5×甲醛电泳缓冲液、甲醛电泳上样缓冲液、1.5%琼脂糖等。

1）5×甲醛电泳缓冲液

0.1mol/L	MOPS（pH 7.0）
40mmol/L	乙酸钠
5mmol/L	EDTA（pH 8.0）

2）甲醛电泳上样缓冲液

50%	甘油
1mmol/L	EDTA（pH 8.0）
0.25%	溴酚蓝
0.25%	二甲苯青 FF

3. 材料

培养的真核细胞或动物新鲜组织或液氮冻存组织。

【方法与步骤】

（1）特殊处理：所用玻璃器皿经160℃～180℃高温干烤6h以上，非耐高温器皿经0.1%DEPC水浸泡后，经高压（20lb，15min）处理灭活RNase。所用试剂均用DEPC水配制后高压处理。

（2）称取兔心肌组织50～100mg，加0.8ml Trizol，剪碎匀浆，移入1.5ml离心管中，再用0.2ml Trizol冲洗匀浆器，移入同一离心管，冰上静置5min。

（3）加0.2ml氯仿，充分震荡混匀，静置3min。

（4）4℃，12 000×*g*离心，15min。

（5）吸上清，加入0.5ml异丙醇，颠倒混匀，－20℃静置2h。

（6）4℃，12000×*g*离心，10min。

（7）弃上清，取沉淀，加入1ml 75%乙醇，充分振荡混匀。

（8）4℃，7500×*g*离心，5min。

（9）弃上清，真空干燥10min。

（10）加40μl DEPC水，充分溶解RNA。

（11）取2μl RNA溶解液，250×稀释，紫外分光光度计测定260nm、280nm OD值，计算OD_{260}/OD_{280}比值，如果比值大于1.7，说明RNA纯度尚可。根据下述公式计算RNA浓度：RNA浓度（μg/μl）＝OD_{260}×稀释倍数×40/1000。

（12）1%甲醛变性胶电泳观察RNA质量：电泳槽及制胶板先用3%过氧化氢浸泡过夜；制1%甲醛变性凝胶板：4.5μl RNA，2μl 5×甲醛胶电泳缓冲液，3.5μl 37%甲醛，10μl甲酰胺，离心混匀，65℃变性15min后迅速置冰浴中；再加入2μl RNA上样缓冲液，离心混匀后上样，6V/cm电压，电泳1～2h；暗室内紫外光下观察，记录。如果观察到清晰的18S、28S RNA电泳带，无大量小分子RNA，说明RNA无明显降解，可以接逆转录步骤，或将样本－70℃保存待用。

【观察与结果】

甲醛凝胶电泳及溴化乙锭染色显示：28S、18S、5S的三条主要的电泳条带（图8-1）。

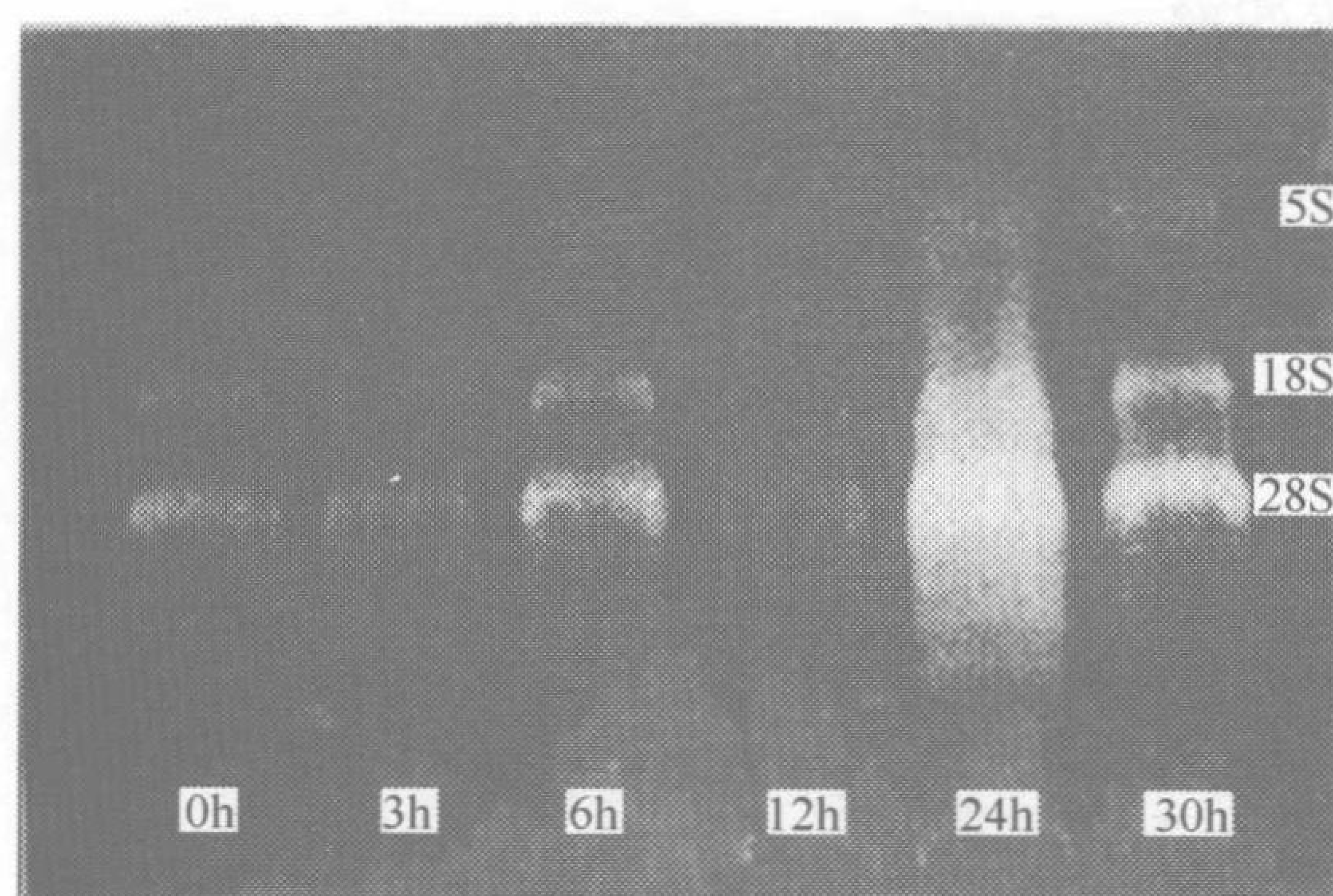


图8-1　细胞总RNA的电泳图谱

【注意事项】

（1）所有的操作都应严格在冰上进行，应戴手套。

（2）玻璃器皿必须 160～180℃干烤 6h 以上，不能干烤的器皿需用 DEPC 浸泡后高压，所需液体需用 DEPC-水配置。

（卞继峰）

8.4　免疫沉淀法分离并定量分析目的蛋白质

【实验原理】

免疫沉淀法是从多种蛋白质混合物中检测分离并定量分析目的蛋白质的一种技术。其基本原理概括来说即向蛋白质混合物中加入目的蛋白质的特异识别抗体，形成抗原抗体免疫复合物。此免疫复合物通过 protein A，protein G，zysorbin，immunoprecipitin 或通过加入第二抗体使其沉淀。沉淀物进一步通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离，测定目的蛋白质的相对分子质量、等电点和定量。免疫沉降技术亦可用于浓缩量极少的蛋白质。浓缩可以高达 1 万倍用于进一步分析。总的来说，免疫沉降技术用于：目的蛋白质相对分子质量的测定和定量、评价蛋白质与蛋白质之间的相互作用、蛋白质合成速率的测定，以及浓缩稀量蛋白质。免疫沉降技术可分为三个主要部分：细胞溶解蛋白质混合物的提取、免疫沉淀和 SDS-PAGE 凝胶电泳分离。

【实验用品】

（1）仪器与用品：微量移液器、吸头、微量离心管、高速低温离心机、液氮罐、玻璃移液管、冰盒等。

（2）试剂：RIPA（radio-immuno-protein-assay）裂解缓冲液、NP-40 裂解缓冲液、加样液等。

（3）材料：培养的真核细胞。

【方法与步骤】

（1）吸去培养液；

（2）用无血清培养液洗 2 次；

（3）加入细胞裂解液裂解细胞（加入细胞裂解液的量，视细胞的多少可多可少。一般来说，1ml 溶解液可溶解 2×10^6～2×10^7 个细胞）；

（4）放置 30～60min（冰上或在 4℃）；

（5）将裂解液及细胞碎片一起吸入预冷的离心管中，离心（10 000×g，20min）；

（6）吸取上清液至新的离心管。通常，每一个样本在 1～1.3ml 操作较方便；

（7）加入 20～50μl 50%（V/V）蛋白质 G（或 A）-Sepharose 悬浮液；

（8）4℃摇转 1h 或过夜；

（9）离心去除蛋白质 G-Sepharose（2000×g，5min）；

（10）吸取上清液至新的离心管；

（11）加入适量抗体，通常 1～3μg 的抗体量为宜，但与抗体的种类，浓度及目的蛋白质的含量有关，需作预试验确定；

（12）4℃放置 1h；

(13) 加入10～20μl50%（V/V）蛋白质G（或A）-Sepharose悬浮液；

(14) 4℃摇转1h；

(15) 离心使蛋白质G（或A）-Sepharose沉淀（2000×g，1min），去除上清液，再用细胞溶解液悬浮，反复3次；

(16) 加入适量（15～30μl）1×加样液悬浮；

(17) 100℃加热3min，离心吸取上清液；

(18) SDS-PAGE凝胶电泳（见本章8.1）。

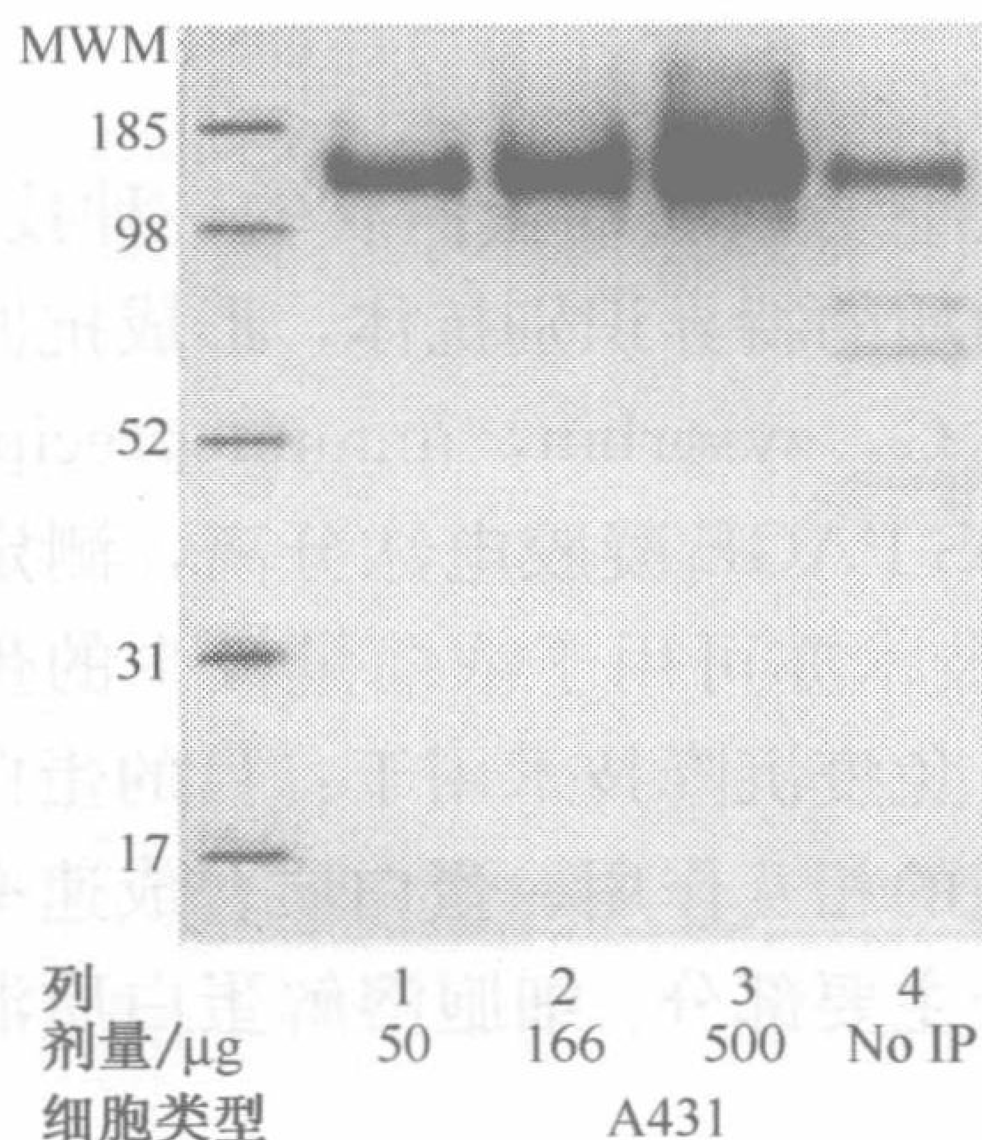


图8-2　A431细胞表皮生长因子受体的免疫沉淀结果

【观察与结果】

在SDS-PAGE胶上可看到一条（有时多条，比如有异构体或不同的蛋白质修饰）清晰的蛋白质条带（图8-2）。

应用Gel Doc™ XR仪器系统和Quantity One-维胶分析软件（BIO-RAD公司）对凝胶中的蛋白质条带进行相应定量分析。也可以应用Image J计算机软件直接对电子版凝胶蛋白条带图像进行相对定量分析。

【注意事项】

(1) 对于贴壁细胞，洗涤时加入无血清培养液，后吸去，如此反复2次。对于悬浮细胞，离心沉淀细胞后，再用无血清培养液悬浮，再离心，反复2次。

(2) 对于贴壁细胞，直接加入细胞溶解液，然后用橡皮刮子刮取细胞，将溶解液及细胞碎片一起吸入预冷的离心管中。对于悬浮细胞，直接将细胞溶解液加入离心沉淀的细胞中。

(3) 蛋白质G（或A）-Sepharose用前，用细胞溶解液平衡，配成50%（V/V）悬浮液。此步骤可除去具有非特异结合性的蛋白质分子。

(4) 正如其他的免疫化学方法一样，应该注意抗体与其他抗原的交叉反应。

(5) 由于许多原因可造成非特异性结合，因此，对照反应的设置非常重要。通常，采用不相关的免疫球蛋白代替抗体（例如，用正常血清代替多克隆抗体，用抗体的isotype代替单克隆抗体）。

【试剂配方】

1) RIPA（radio-immuno-protein-assay）裂解缓冲液

50 mmol/L	Tris-HCl，pH 7.4
1 mmol/L	PMSF
1%	NP-40
1%	脱氧胆酸钠（sodium deoxycholate）
0.1%	SDS
0.15mol/L	NaCl
1 mmol/L	EDTA

5 μg/ml	抑酞酶（aprotinin）
5 μg/ml	亮肽酶素（leupeptin）
1%	Triton X-100

特性：细胞溶解能力强，可溶解几乎所有的蛋白质，背景低。但应注意细胞量过多，溶解液过于黏稠，会影响免疫沉淀，还可破坏细胞内蛋白质复合物。另外，可使有些蛋白质变性。

2）NP-40 裂解缓冲液

50mmol/L	Tris-HCl
150mmol/L	NaCl
1%	NP-40

调整 pH 至 8.0

特性：由于变性能力较弱，常用于磷酸化及蛋白质与蛋白质之间相互作用的研究。

3）加样液

10%	丙三醇（glycerol）
5%	2-巯基乙醇（2-mercaptoethanol）
3%	SDS
65mmol/L	Tris-HCl（pH 6.8）

（单良　李炳生）

8.5　蛋白质免疫印迹法

【实验原理】

免疫印迹法（immuno/western blot）是一种与 DNA 印迹（southern blot）和 RNA 印迹（northern blot）相类似的蛋白质印迹技术，该技术通常是用特异的抗体作为探针检测吸附在滤膜上的蛋白质。具体作法和原理是，将蛋白质样品（通常为组织或细胞提取物）进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后转移到乙酸纤维膜或 Immobilon-P 膜上，再将膜与拟检测蛋白质的抗体共同孵育，使这种第一抗体与特定蛋白质结合。然后进一步将膜与第一抗体的种属特异性抗体共同孵育，使这种酶标记的第二抗体与第一抗体结合。最后将膜与酶特异底物共同孵育，通过酶底物的化学发光来显示拟检测蛋白质的存在。这种方法不仅能测定蛋白质的分子质量，同时也能相对地检测样品中特定蛋白质的含量。此方法的关键是要使用特异性高和亲和力强的抗体。只要有好抗体，就可以用这种方法简便地检测蛋白质，例如，应用抗 EGF 受体的抗体来检测多种细胞系细胞内的 EGF 受体的含量。

【实验用品】

（1）器材：电泳转移装置、旋涡振荡器、乙酸纤维素膜、Whatman 3MM 滤纸、塑料反应盒、稳压直流电源、X 射线胶片、显影机等。

（2）试剂：电泳转移溶液、TBST 溶液、封闭溶液、第二抗体（Amersham 公司）、ECL 化学发光试剂盒（Pierce 公司）。

（3）材料：哺乳动物培养细胞或动物组织的提取物。

【方法与步骤】

1. 蛋白质 SDS-PAGE 凝胶电泳（见本章 8.1）

2. 蛋白质转移

待电泳结束后取出凝胶，与一张乙酸纤维素膜及两张 Whatman 3MM 滤纸一起浸入转移溶液中浸泡 2min。按图 8-3 所示安装好转移装置，打开 Pad-holder，阴侧的海绵垫的上依次放上 Whatman 3MM 滤纸、凝胶、乙酸纤维素膜、Whatman 3MM 滤纸。在叠合过程中，要避免形成气泡。一般以 15V 电压在冷室内转移 12h。

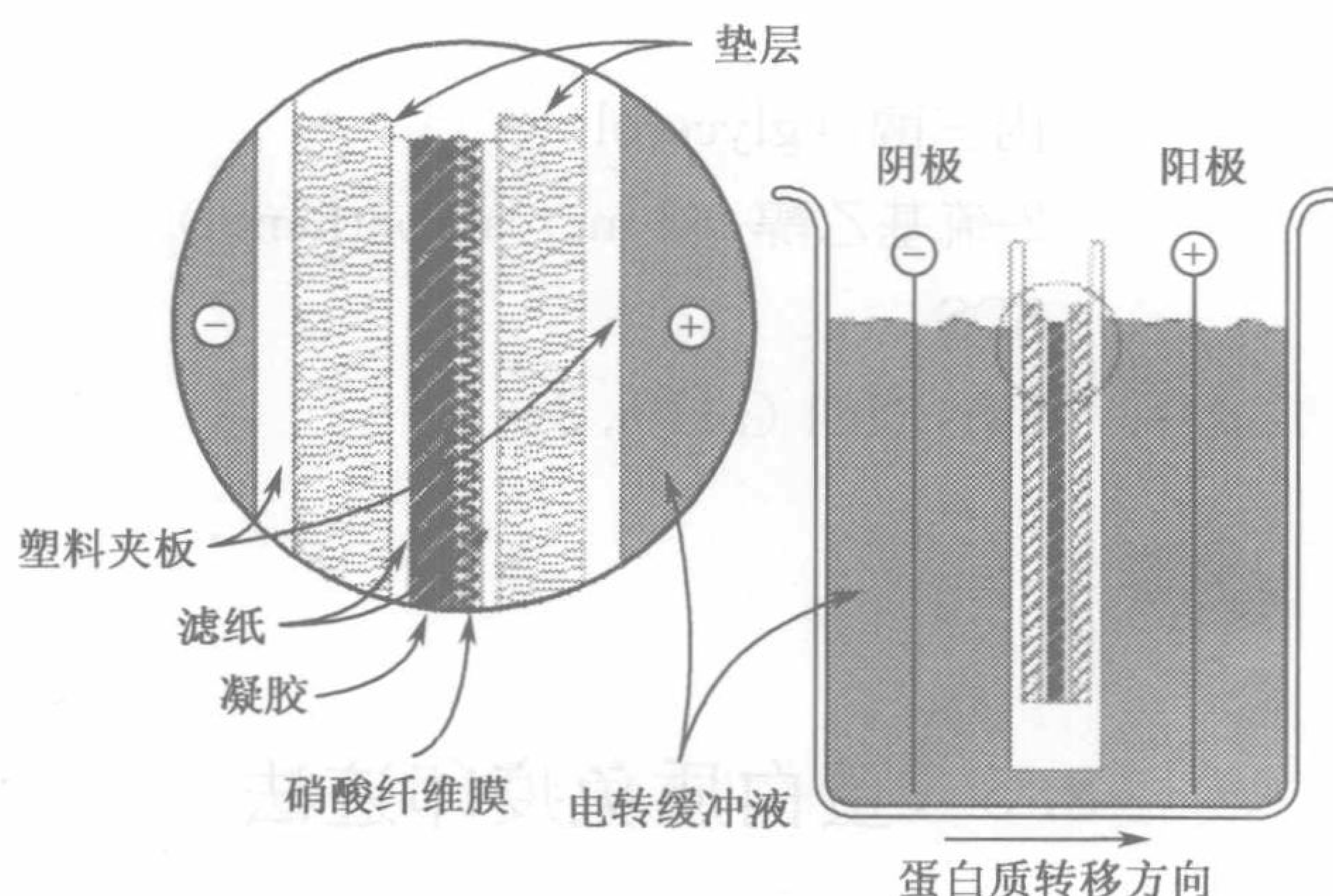


图 8-3　蛋白质转移槽的装置及蛋白质转移的方向

3. 蛋白质检测

（1）取出乙酸纤维素膜，放入适量的封闭溶液中在室温下振荡 1h；

（2）弃去封闭溶液，放入适量的用封闭溶液稀释的第一抗体，在室温下振荡 1h；

（3）弃去第一抗体溶液，将乙酸纤维素膜用 TBST 溶液洗 3 次后，放入适量的用封闭溶液稀释的第二抗体，在室温下振荡 1h；

（4）弃去第二抗体溶液，将乙酸纤维素膜用 TBST 溶液洗 3 次后放入适量的 ECL 化学发光底物反应 1～5min；

（5）将乙酸纤维素膜用保鲜膜包好后放入 X 射线胶片曝光 1～10min 后，把 X 射线胶片用显影机显影。

【观察与结果】

在 X 射线胶片上可看到一条或多条黑色清晰的显影带（图 8-4）。

【注意事项】

（1）近年来，许多研究者用 Immobilon-P 代替乙酸纤维素膜，但这种膜是疏水性

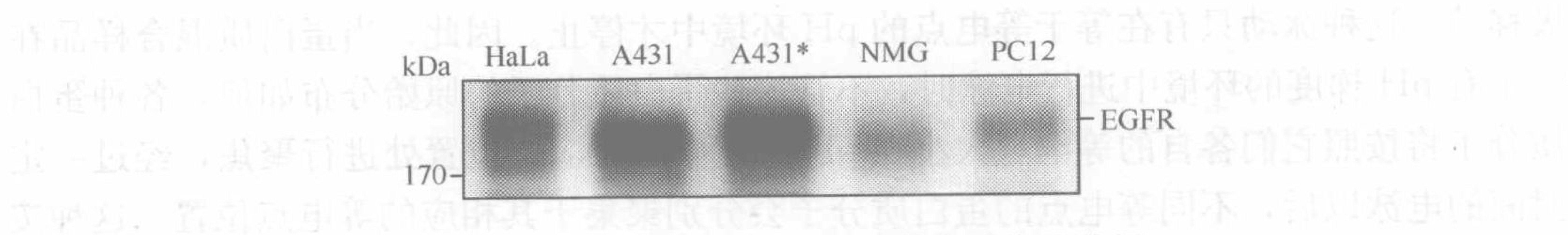


图8-4 多种细胞系的EGF受体免疫印迹分析

的，使用前须用甲醇处理30s，以后依次是水和转移溶液各2min。

(2) 关于转膜的条件，也可以用高电压（30V）室温下转移2h。但最重要的是应根据胶的组成和要检测蛋白质的分子质量范围来决定最佳的转移条件。

(3) 转移的乙酸纤维素膜的封闭及第一抗体反应也可以选择在冷室内震荡12 h。

(4) 关于第一抗体的浓度，一般提纯的抗体为0.5～2.0 μg/ml，抗血清1∶100～1000倍稀释，但最关键的是要通过预实验来确定最佳的抗体稀释度。

(5) 在选择第二抗体时，要严格注意种属特异性。例如，如果第一抗体是小鼠IgG，第二抗体就应选择抗小鼠IgG的抗体。第二抗体的浓度首先要参照生产厂家的建议，但最终也要通过预实验来选择最佳的稀释度。

【试剂配方】

(1) 电泳转移溶液：25mmol/L Tris-HCl，192mmol/L glycine，20%（*V/V*），methanel，0.01%（*m/V*）SDS。

(2) TBST溶液：20mmol/L Tris-HCl，150mmol/L NaCl，0.1% Tween-20。

(3) 封闭溶液：用TBST溶液配制5%脱脂奶粉。

（李绍巍 李炳生）

8.6 蛋白质双向电泳分析细胞和组织中的蛋白质群

蛋白质双向电泳是利用蛋白质的带电性和相对分子质量大小的差异，通过两次凝胶电泳达到分离蛋白质群的技术。第一向电泳依据蛋白质的等电点不同，通过等电聚焦（isoelectric focusing，IEF）将带不同净电荷的蛋白质进行分离。在此基础上进行第二向的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），依据蛋白质相对分子质量的不同将之分离。经过这两步，可以把复杂蛋白混合物中的各种蛋白质在二维平面上分离开来，通过生物质谱及数据库搜索，可将之鉴定。蛋白质双向电泳的分辨率和灵敏度很高，一般可同时分辨约2000个蛋白质，最高时能同时分辨11 000个蛋白质，已成为研究蛋白质组学的最有价值的核心方法和技术。

【实验原理】

等电聚焦是一种特殊的聚丙烯酰胺凝胶电泳，其特点是在凝胶中加入两性电解质载体，从而使凝胶在电场中形成连续的pH梯度。蛋白质是典型的两性电解质，其氨基酸残基上所带正、负电荷的总和是该蛋白质所带的净电荷。在低pH时，蛋白质的净电荷是正的，在高pH时，其净电荷是负的，但在某一pH时，它的净电荷为零，此pH即为该蛋白质的等电点（isoelectric point，p*I*）。蛋白质在大于其等电点的pH环境中以阴离子形式向电场的正极移动，在小于其等电点的pH环境中以阳离子形式向电场的负

极移动。这种泳动只有在等于等电点的 pH 环境中才停止。因此，当蛋白质混合样品在一个有 pH 梯度的环境中进行电泳时，不管这些蛋白质分子的原始分布如何，各种蛋白质分子将按照它们各自的等电点大小在 pH 梯度中相对应的位置处进行聚焦，经过一定时间的电泳以后，不同等电点的蛋白质分子会分别聚集于其相应的等电点位置，这种按等电点的大小，生物分子在 pH 梯度的某一相应位置上进行聚焦的行为就称为“等电聚焦”。

通过等电聚焦各种不同的蛋白质在电泳结束后，形成很窄的一个区带，蛋白质区带的位置，是由电泳的 pH 梯度的分布和蛋白质的 p*I* 所决定的，而与蛋白质分子的大小和形状无关。在此基础上再按照各种蛋白质的相对分子质量大小进行 SDS-PAGE 电泳分离（原理参见本节 8.1）。样品中的蛋白经过等电点和相对分子质量的两次分离后，可以得到分子的等电点、相对分子质量和表达量等信息。值得注意的是，双向电泳分离的结果是蛋白质点而不是条带。根据 Cartesin 坐标系统，从左到右是 p*I* 的增加，从上到下是分子质量的减少（见图 8-5 双向电泳示意图）。

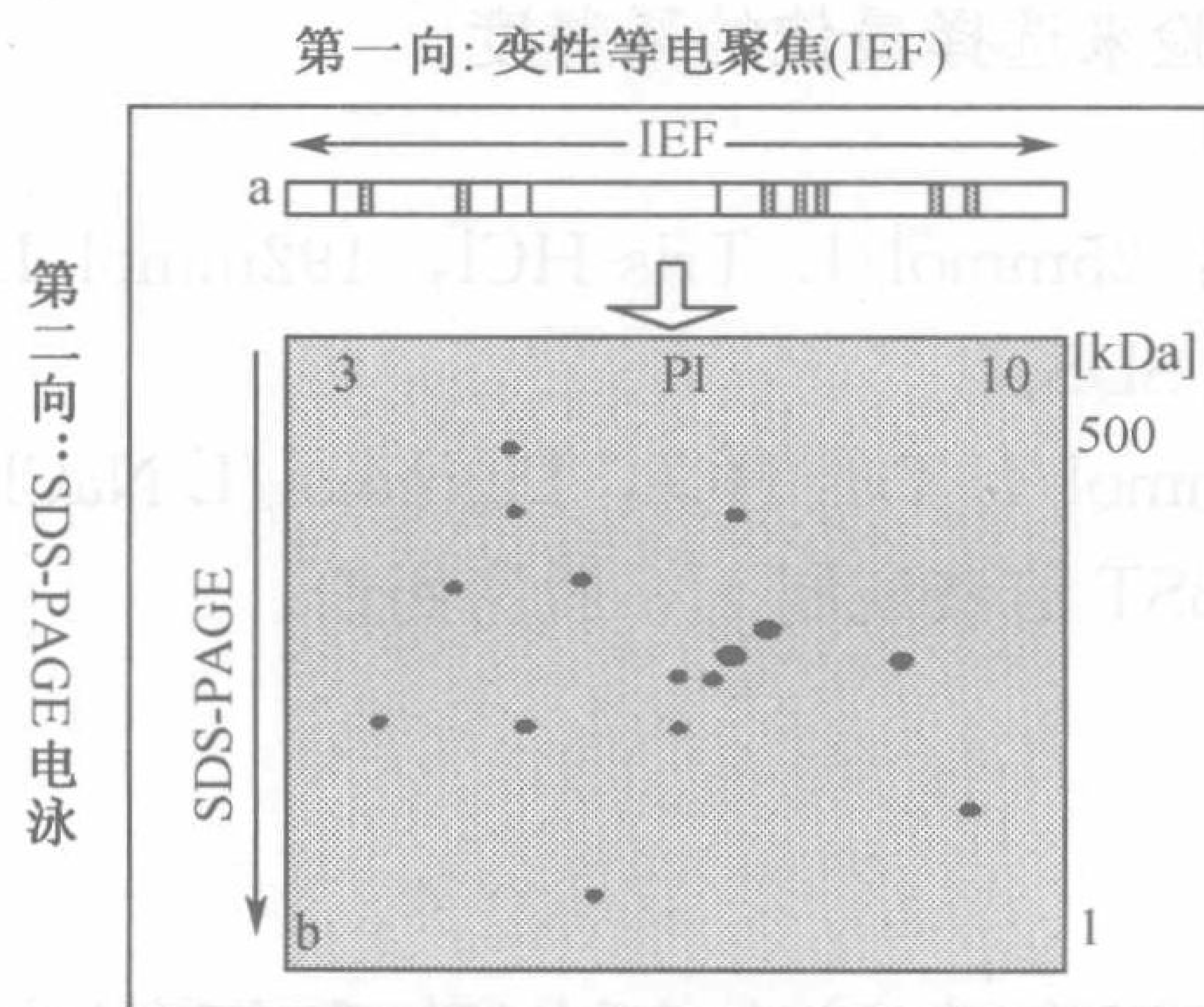


图 8-5　蛋白质双向电泳示意图

a. 第一向：等电聚焦（IEF），根据蛋白质等电点分离得到的蛋白质带；
b. 第二向：SDS-PAGE 电泳，根据蛋白质相对分子质量大小分离得到的蛋白质点

根据第一向等电聚焦的条件和方式的不同，可将双向电泳分为三种系统：ISO-DALT、NEPHGE 和 IPG-DALT。①在 ISO-DALT 系统中，等电聚焦在聚丙烯酰胺管胶（tube gel）中进行，两性电解质载体在外加电场作用下形成 pH 梯度。这种系统的优点是电泳设备要求不高，溶液配制容易，但是 pH 梯度在碱性区不稳定（阴极漂移）、重复性不易掌握和上样量低为其主要的缺点。②NEPHGE 为非平衡 pH 梯度电泳，是 IPG 胶发明前使用的分离碱性蛋白质的一种方法，蛋白质在等电聚焦场中达到平衡前结束电泳，第一向的 pH 也是依靠载体两性电解质和电场来建立的。③IPG-DALT 的第一向电泳是采用 IPG 胶条，其 pH 梯度的形成依赖于不同 p*K* 值的化合物 immobiline。这种 pH 胶条的 pH 梯度是稳定的，不依赖于外加电场，因而 IPG-DALT 具有更高的分辨率、重复性和信息量，在进行蛋白质组学研究中更为常用。

【实验用品】

1）仪器与用品

IPG-DALT 双向电泳系统、稳压或稳流直流电源、紫外可见分光光度仪或酶标仪、

振荡仪、胶条槽、IPG胶条（pH3～10，NL）、边条、电泳玻璃板、注射器、微量移液器、吸头、EP管、矿物油、镊子、加样滤纸等。

2）试剂

小牛血清白蛋白（BSA）标准、考马斯亮蓝染料G-250、聚丙烯酰胺母液（30%）、Tris-HCl缓冲液（1.5mol/L，pH8.8）、10% SDS、10%过硫酸铵、TEMED、DTT、IAA、分离胶（12%）、电极缓冲液（pH8.3）、低熔点琼脂糖以及银染所需的化学试剂等。

主要试剂配方：

（1）裂解液：尿素7mol/L、硫脲2mol/L、CHAPS 4%、DTT 65mmol/L、IPG缓冲液2%；

（2）再水化液：尿素 8mol/L、CHAPS 2%、DTT 1.5mmol/L、IPG 缓冲液0.5%；

（3）平衡缓冲液：Tris-HCl 0.05mol/L pH 8.8、尿素6mol/L、甘油30%(m/V)、SDS 2%(m/V)；

（4）单体储存液：丙烯酰胺29.2%，甲叉双丙烯酰胺0.8%；

（5）胶缓冲液：Tris-HCl 1.5mol/L pH8.8，用时4倍稀释；

（6）电极缓冲液：Tris 250mmol/L pH8.3、甘氨酸192mmol/L、SDS 1%，用时10倍稀释。

3）材料

哺乳动物培养细胞或组织。

【方法与步骤】

1. 样品制备

基本的原则：①尽可能地提高样品蛋白的溶解度，抽提最大量的总蛋白，减少蛋白质的损失、降解；②减少对蛋白质的人为修饰；③破坏蛋白质与其他生物大分子的相互作用，并使蛋白质处于完全变性状态，操作步骤如下：

（1）裂解液配制：尿素7mol/L、硫脲2mol/L、CHAPS 4%，用纯水溶解至10ml，分装成500μl于−20℃储存，使用时，每500μl液体加DTT 5mg、IPG缓冲液（pH3～10，NL：非线性）10μl；

（2）培养细胞的收集；

（3）用磷酸缓冲液（PBS）洗细胞3次（室温，1000g离心，各2min）；

（4）将细胞分装到1.5ml EP（eppendorf）管中，吸干残留的PBS；

（5）加入裂解液（1.5×10^6个细胞约加入100μl裂解液），室温振荡1h，使其充分溶解；

（6）4℃，40 000g，离心1h；

（7）吸取上清液并用Brandford法定量蛋白，然后分装至EP管里−80℃保存备用。

2. 蛋白质定量

蛋白质的快速定量方法主要依靠蛋白质本身的发色基团或其与其他显色剂反应产生

的紫外吸收来进行定量。表 8-1 为五种蛋白质的测定方法的比较。目前常用的主要有直接紫外吸收法、Bradford 法和 Lorry 法三种。

表 8-1 五种蛋白质测定方法的比较

方法	灵敏度	原理	干扰物质
凯氏定氮法（Kjedahl 法）	0.2～1.0mg	将蛋白质转换为氮，用酸吸收后滴定	非蛋白氮（可用三氯乙酸沉淀蛋白质而分离）
双缩脲法（Biuret 法）	1～20mg	多肽键加碱性铜离子生成紫色络合物	硫酸铵，Tris 缓冲液和某些氨基酸
Folin-酚试剂法（Lowry 法）	5μg	磷钼酸-磷钨酸试剂被 Tyr 和 Phe 还原	硫酸铵，Tris 缓冲液，甘氨酸，各种硫醇
考马斯亮蓝法（Bradford 法）	1～5μg	考马斯亮蓝染料与蛋白质结合时其 λmax 由 465nm 变为 595nm	强碱性缓冲液，TritonX-100，SDS
紫外吸收法	50～100μg	蛋白质中的酪氨酸和色氨酸残基在 280nm 处的光吸收	各种嘌呤和嘧啶，各种核苷酸

1）直接紫外吸收法

由于蛋白质中存在着含有共轭双键的酪氨酸和色氨酸，所以任何一个蛋白质都具有 280nm 附近的紫外吸收峰，在此波长范围内，蛋白质溶液的光密度 OD280nm 与其浓度呈正比关系，可以对其进行定量。但该法存在无法弥补的缺陷。首先，对于测定那些与标准蛋白质中酪氨酸和色氨酸含量差异较大的蛋白质，有一定的误差，故该法适于测定与标准蛋白质氨基酸组成相似的蛋白质。其次，若样品中含有嘌呤、嘧啶等吸收紫外光的物质，会出现较大干扰。

2）Lorry 定量法

蛋白质与碱性铜溶液中的 Cu^{2+} 络合使得肽键伸展，从而使暴露出的酪氨酸和色氨酸在碱性铜条件下与福林试剂反应，产生蓝色，在一定浓度范围内，其颜色的深浅与蛋白质中的酪氨酸和色氨酸的含量成正比，由于各种蛋白质中的酪氨酸和色氨酸的含量各不相同，因此在测定时需使用同种蛋白质作标准。

3）改良 Bradford 法

实验室通常采用改良 Bradford 法进行蛋白质含量测定。其原理为：蛋白质与染料考马斯亮蓝 G-250 结合，使得染料最大吸收峰从 465nm 变为 595nm，在一定的线性范围内，反应液 595nm 处吸光度的变化量与反应蛋白量成正比，测定 595nm 处吸光度的增加即可进行蛋白定量。只需将 EP 管换为 96 孔板并相应的减少各个试剂的用量，这种方法可以应用到大规模高通量的试验中，可以同时进行 384 个样品的全自动准确定量。本实验要达到两个目的，保证相比较样品间的相对量的一致及绝对量的相对准确。操作步骤如下：

（1）将标准品 BSA（5mg/ml）先稀释成 0.5 mg/ml。

（2）按 0μl、1μl、2μl、4μl、8μl、12μl、16μl、20μl 分别加到 96 孔板中，加双蒸水补足至 20μl。

（3）加适当体积样品（4μl）到 96 孔板的样品孔中，加双蒸水至 20μl。

（4）各孔加入 200μl G-250 染色液，室温放置 3～5min。

（5）用酶标仪测定 A595，或 560～610nm 之间的其他波长的吸光度。

(6) 根据标准曲线计算出样品中的蛋白浓度。

3. 等电聚焦

根据建立 pH 梯度原理的不同，梯度又分为载体两性电解质 pH 梯度（carrier ampholytes pH gradient）和固相 pH 梯度（immobilized pH gradient）。前者是在电场中通过两性缓冲离子游离建立 pH 梯度（线性）。后者是将缓冲基团共价键结合在介质上成为凝胶介质的一部分而建立 pH 梯度（线性和非线性），分辨率比前者高一个数量级。

在固相 pH 梯度的发展中，为了改善结果，简化操作，把 IPG 胶灌到塑料支持膜上形成商品化的固定干胶条，即 IPG 胶条。本实验采用的固定干胶条（immobiline pH-gradients，IPG）是由基质和聚丙烯酰胺形成一个整体，pH 梯度的产生是由酸性和碱性基团与聚丙烯酰胺以梯度式共价键连接而形成。所以它是固相的，即使是在电场中也不会漂移。利用缓冲体系滴定终点附近一段 pH 范围就可形成近似线性的或非线性分布的在 pH3～10 范围的缓冲体系。操作步骤如下：

(1) 用再水化液补足用裂解液溶解的蛋白样品（约 100μg）体积，一般 18cm 的胶条加再水化液后的终体积是 350μl。蛋白质上样浓度不要超过 10mg/ml，否则会造成蛋白质的集聚或沉淀。

(2) 将溶解好的样品加入标准型 18cm 胶条槽中。

(3) 从酸性端（尖端）一侧剥去 IPG 胶条的保护膜，胶面朝下，先将 IPG 胶条尖端（阳性端）朝胶条槽的尖端方向放入胶条槽中，慢慢压下胶条，并前后移动，避免产生气泡，最后放下 IPG 胶条平端（阴极），使再水化液浸湿整个胶条，并确保胶条的两端与槽的两端的电极接触。

(4) IPG 胶条上覆盖适量矿物油约 350μl，加盖胶条槽盖。

(5) 将标准型胶条槽的尖端背面电极与 IPGphor 仪器的阳极平台接触；胶条槽的平端背面电极与仪器的阴极平台接触。

(6) 设置 PGphor 仪器运行参数：胶条水化的电压，温度和时间；等电聚焦电泳时的梯度电压和温度。

(7) 暂时不进行第二向的 IPG 胶条可夹在两层塑料薄膜中于－80℃保存几个月。

4. IPG 胶条的平衡

蛋白质经过第一向电泳后得到了初步分离，凝胶条中所含的蛋白质区带，为第二向电泳的样品，因此，进行第二向电泳前，要将第一向电泳后的凝胶条包埋在第二向电泳的凝胶板中。因为两向电泳的分离系统不同，需将第一向电泳后的凝胶预先在第二向电泳分离系统中振荡平衡，再包埋于第二向电泳凝胶板的电泳起始端，然后按照 SDS-PAGE 的方法进行电泳。

平衡过程分为两步：第一步平衡液的成分主要是 Tris 缓冲液、SDS、DTT、尿素和甘油。平衡的主要作用是使第一向胶条上的蛋白质变性。平衡液中的尿素和甘油可以增加溶液的黏度，减少电内渗。电内渗作用是由固相化的两性电解质造成的，它影响蛋白质从第一向到第二向转移。SDS 用于变性蛋白质，使蛋白质带上负电荷，这对第二向 SDS-PAGE 来讲是十分重要的。DTT 是为了在蛋白质与 SDS 充分结合的同时，二硫

键也得到还原；第二步的平衡液是用 IAA（碘乙酰胺）代替 DTT，这一步是用来烷基化自由 DTT 和蛋白质所带的自由巯基，否则，自由 DTT 在二向迁移过程中会产生假条纹现象，在银染后会观察出来。两次平衡的时间均为 15min。操作步骤如下：

（1）平衡缓冲液配制：Tris-HCl 0.05mol/L pH 8.8、尿素 6mol/L、甘油 30%（*m*/*V*）和 SDS 2%（*m*/*V*）；

（2）使用前每 10ml 平衡缓冲液中加入 100mg DTT，取出 IPG 胶条分别放入平衡管中（支持膜贴着管壁，每个管中放入一根 IPG 胶条），在振荡仪上平衡 15min 后倒掉平衡缓冲液；

（3）每 10ml 平衡缓冲液中加入 250mg IAA（碘乙酰胺），胶条置于管中在振荡仪上平衡 15min 后倒掉缓冲液。

5. 蛋白质 SDS-PAGE 凝胶电泳

1）灌胶

平衡前事先装好灌胶模具，倒入凝胶溶液。灌胶后立即在每块凝胶上铺上一层水饱和正丁醇或异丁醇，以减少凝胶暴露于氧气，形成平展的凝胶面。同时灌注多块凝胶时，在室温下至少聚合 3h。聚合后倒掉覆盖在凝胶上的正丁醇溶液，并用凝胶储存液冲洗凝胶表面。

2）IPG 胶条的转移

用去离子水润洗一下平衡好的胶条，将胶条的边缘贴于滤纸上，以去除多余的平衡液。然后将胶条放在玻璃板之间的凝胶面上，使胶条支持膜贴着其中的一块玻璃板，用一薄尺将 IPG 胶条轻轻的向下推，使整个胶条的下部边缘与凝胶上表面完全接触。确保在 IPG 胶条与凝胶表面之间及玻璃板与塑料支持膜之间无气泡产生。

3）加入相对分子质量标准蛋白

加入相对分子质量标准蛋白溶液到上样纸片上，然后将上样纸片用镊子放置在 IPG 胶条末端一侧，与凝胶表面接触。

4）包埋

最后用琼脂糖密封液进行包埋，用少量的密封液使 IPG 胶条被完全覆盖固定住，在此过程中避免产生气泡。

5）电泳步骤

待琼脂糖凝固后，电泳槽中装满电泳缓冲液，并打开温控系统，调节温度在 15℃。将胶盒插入电泳槽中，调节电泳参数，先进行样品浓缩设电流（mA/gel）15mA，15min，再进行电泳分离设电流 30mA，约 4h 左右；

6）打开电源开始电泳

当溴酚蓝染料迁移到胶的底部边缘即可结束电泳。

7）将跑好的胶转移到染色盒中固定，准备染色。

6. 胶上蛋白质的检测

显示双向凝胶上的蛋白质点的方法有多种，例如，考马斯亮蓝 R-250（CBB R-250）、CBB G-250、酰胺黑（Amido Black）、丽春红 S（Ponceau S）、银染、负染、

荧光染料染色以及放射性同位素标记等。

本实验使用的是银染。基本原理是：银离子在碱性 pH 环境下被还原成金属银，沉淀在蛋白质的表面上而显色。由于银染的灵敏度很高，可染出胶上低于 1ng/蛋白质点，故广泛应用在 2DE 凝胶分析上。待找到自己感兴趣的蛋白质点后，再通过考染富集该目的点，然后做进一步的肽段指纹图谱分析（PMF）或序列测定。随着质谱技术的不断完善和发展，对银染后的 fmol（10^{-15}mol）级的蛋白质点直接测定已非难事。操作步骤如下：

（1）固定：①每条胶用 150ml 固定液（50%甲醇和 5%乙酸）固定 20min；②150ml 50%甲醇冲洗 10min；③去离子水冲洗 10min。

（2）敏化：①150ml 0.02%硫代硫酸钠敏化 1min；②超纯水漂洗 2 次，每次 1min。

（3）银染：①将胶条浸入 150ml 0.1%硝酸银和 0.08% 甲醛（37%）20min；②超纯水漂洗两次，每次 1min。

（4）显色：150ml 2% 碳酸钠和 0.04%甲醛（37%）浸泡，直至显色（需要新鲜配制）。

（5）终止：①胶条用 150ml 5%乙酸冲洗 10min；②超纯水冲洗。

（6）保存：扫描完毕的胶可用保鲜膜包好或用 8%甘油或乙醇于 4℃下保存。

7. 2-DE 凝胶的检测

目测或通过计算机辅助自动化检测：

1）目测

目测是比较精确的，蛋白质斑点强度有 10%的变化就能可靠地检测出来。对不同凝胶上寻找对应斑点时，目测比自动匹配要容易得多。而且，目测也不要昂贵的软件和硬件，但随着需要检测的蛋白质斑点的增多、凝胶的增大，目测工作也越来越繁重。要在 20 块 30cm×40cm 的凝胶中比较一个蛋白质斑点的强度几乎不可能。

2）自动化检测

通过监视器把感兴趣的斑点放在 20 个窗口中比较，同时也可控制计算机强度差值。对自动化检测来说，最好的凝胶质量、最佳的斑点检测参数以及交互式人机对话是必要的。其过程分为 5 步：①扫描数据的数字化；②背景和污点的校正；③斑点的检测；④定量表示；⑤不同凝胶的匹配比较。

3）2-DE 的数据库

来自 2-DE 凝胶上蛋白质减法分析（附加斑点、丢失斑点、强度差异）、鉴定出的大量数据储存在 2-DE 数据库中，在 Electrophoresis 杂志上每年发表一次，其中部分数据可通过互联网蛋白质数据库获得。例如，人类心脏蛋白质 2-DE 数据库中有 3239 个蛋白质，到目前为止，已有 66 个被注册。在这个数据库中，注释所使用的标准有：扩张性心肌病相关蛋白质、N 端序列、内部序列、氨基酸组成、蛋白质名称、相对分子质量、等电点以及与鉴定有关的参照。研究者可将其从这个数据库直接转到自己的数据库进行比较。

【观察与结果】

图 8-6 为一张较理想的鼠脑组织双向电泳银染图谱。首先从鼠脑组织中提取蛋白质

组，经总蛋白定量后上样量为 100μg，在 pH 3～10 非线性固定干胶条上行等电聚焦，在电流的作用下蛋白质根据各自所带电荷不同在胶条上移动，迁移至其等电点处停止，经 25h 聚焦后，得到分布在该固定干胶条上百余条蛋白带（从左到右是 pI 的增加，由酸性到碱性）。然后将第一向胶条平衡后转到聚丙烯酰胺胶的第二向上，根据蛋白质相对分子质量的不同进行垂直胶分离（从上到下分子质量逐渐减少，其范围分布为 200～20kDa）。经二维分离后对所得胶进行银染再成像扫描后即得此图。由目测所观察到的圆点即代表一个或数个组分蛋白质。经软件分析后得到数千个蛋白点。根据比较情况，将所感兴趣的蛋白点切下、脱色、酶解、肽提取、干燥，采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱（matrix assisted laser desorption ionization-time of flight/mass spectrometry，MALDI-TOF/MS）或电喷雾电离四极杆串联质谱（electro spray ionization-MS/MS，ESI-MS/MS），得到所感兴趣蛋白点的肽质量指纹图或氨基酸序列，经数据库搜索，即可鉴定该点蛋白质。

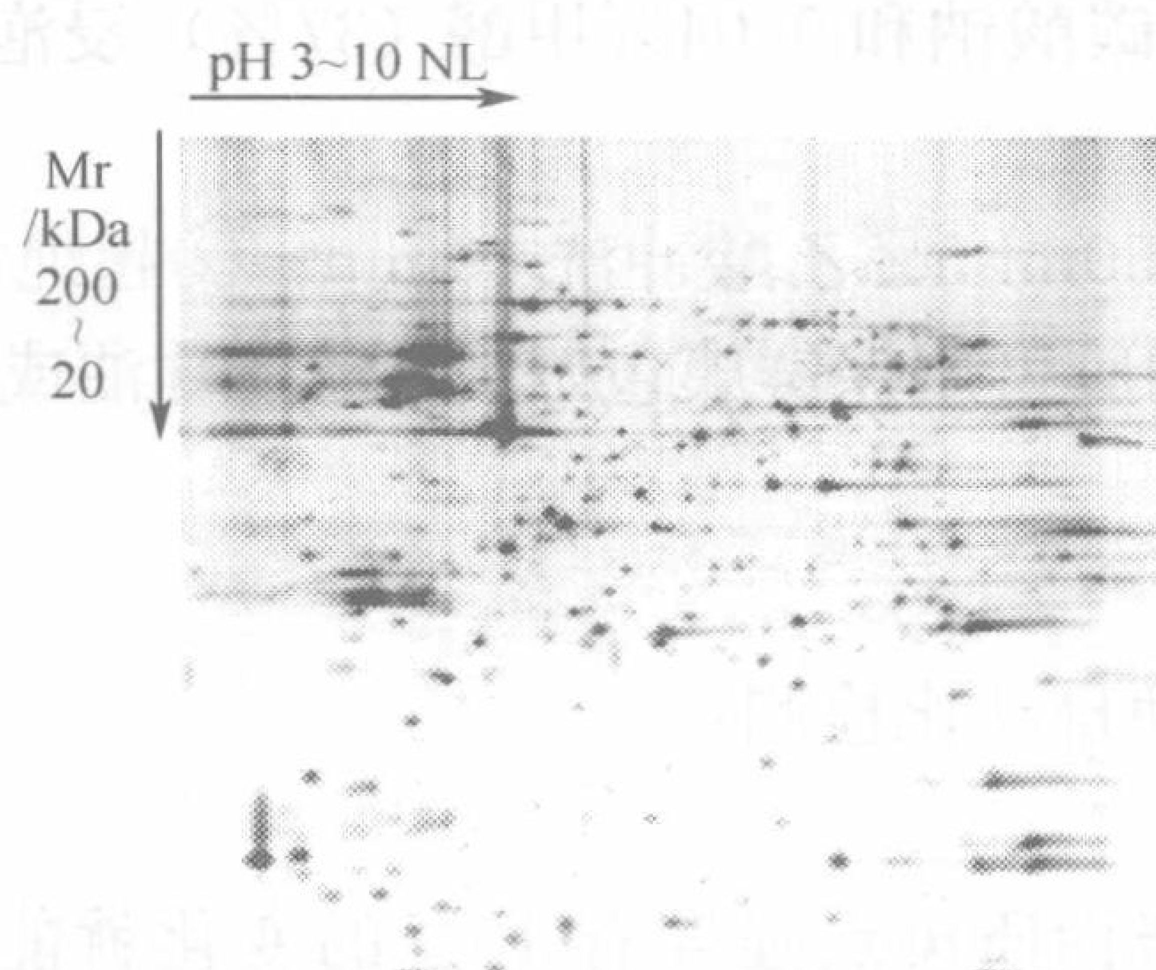


图 8-6　鼠脑组织双向电泳银染图

【注意事项】

(1) 等电聚焦过程中要避免电流过大，因为胶条所承受的电流有限，一般在等电聚焦中限流 50mA。等电聚焦的电压上升分为三个阶段，首先加上一个比较低的电压，去除胶条中的过多的盐离子。然后加高压，电压上升的模式为缓慢上升。最后是持续高压，电压上升的模式为快速上升。运行的时间决定于几个不同的因素，包括样品类型、蛋白上样量、IPG 胶条长度及所用 pH 梯度。根据胶条的 pH 范围和上样量的多少，总电压时间可以在一定范围内调整。理论上讲，获得最好的图谱质量和重复性所需最佳时间是等电聚焦分离达到稳定态所需的时间。

(2) 操作 IPG 胶条时应戴手套，有助于减少蛋白质污染而造成的人为斑点。

(3) 任何含尿素的溶液加热时都不要超过 30℃，尿素降解产物异氰酸盐可使样品中的蛋白质甲氨酰化，造成等电点改变。

(4) 样品中含盐量较高时，应选用慢速升压。样品中含盐量一般时，选用线性升压。样品中含盐量很少时，可以选用快速升压。这样可以节省聚焦时间。

(5) 随着等电聚焦的进行，溴酚蓝指示剂会向阳极移动。等电聚焦完成前染料会完全泳出胶条的聚焦部分，因此染料的泳出并不意味着样品已经聚焦。若染料不移动，说明没有电流，应检查电极与胶条的接触。

（6）SDS 结合蛋白质分子的量取决于平衡时 SDS 的单体浓度，而非总浓度。只有在低离子强度的溶液中，SDS 单体才具有较高的平衡浓度。因此，SDS 电泳的样品缓冲液离子强度较低，常为 10～100 mmol/L。

（7）选择适宜的缓冲体系和凝胶浓度。二硫键被彻底还原，蛋白质分子才能被解聚。因此要控制好还原剂 DTT 或 β-巯基乙醇的浓度。

（8）为减少蛋白条带的扩散，上样后应尽快进行电泳，电泳结束后直接进行固定或染色。

（9）垂直条纹的原因有：①蛋白质从一向转移到二向时发生沉淀。避免的措施为提高平衡的 SDS 浓度，适当延长平衡时间。②蛋白质上样量过大。应适当减少上样量。③水不够纯净，SDS-PAGE 胶配置时没有过滤（背景有极细的条纹）或者胶条平衡后仍然带有额外的 DTT。可以使用 Millipore 水，过滤胶液或使用 IAA 平衡 IPG 胶条，去除额外的 DTT。

（10）点纹理的原因：有时是由于 SDS 凝胶的支持膜引起的。为此在灌注 SDS 凝胶前应用双蒸水漂洗支持膜 6 次，每次 10min。如果必要，第一向电泳用的凝胶支持膜也应漂洗。

（刘师莲）

参 考 文 献

郭尧君. 2006. 蛋白质电泳实验技术. 北京：科学出版社. 199～204
钱小红. 贺福初. 2003. 蛋白质组学. 北京：科学出版社. 68～87
Ausubel F M. et al. 2003. Current protocol in Molecular Biology. John Wiley & Sons，Inc.
Gorg A，Postel W，Weser J et al. 1998. Approach to stationary. Two-dimensional pattern：influence of focusing time an immobilized/carrier ampholytes concentrations. Electrophoresis，9（1）：37～46
Mason D W，Williams A F. 1986. Kinetics of antibody reactions and the analysis of cell surface antigens. In：Weir D M，HerzenbergL A，BlackwellC et al. Handbook of Experimental Immunology. Blackwell，Oxford
Sambrook J，Fritsch E F，ManiatisT. 1998. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press

第9章 真核细胞基因转染与表达技术

随着人类和许多动植物基因组计划的完成，基因研究也进入了后基因组时代。其中，一个重要的领域就是基因的调节、基因产物的分离及其功能确定。DNA 转染技术是最为常用的研究工具之一。下述转染方法，在很大程度上，也适用于各种类型 RNA（mRNA、siRNA、miRNA）的细胞内导入。

9.1 DNA 转染技术

DNA 转染技术就是将外源目的 DNA 导入细胞，插入细胞基因组内，使目的基因利用宿主细胞基因表达机制，在细胞内表达的方法。将外源 DNA 导入细胞内有化学的、生物的或机械的方法。主要方法包括磷酸钙转染法（DNA-$CaPO_4$）、电穿孔法（electroporation）、病毒载体法（virus vector）、脂质转入法（lipofection）、基因枪法（gene guns）和显微注射法（microinjection）。但是，目前没有一种万能方法或转染试剂适用于所有类型的细胞。转染效率也千差万别，不仅取决于细胞的种类，也取决于转染方法和试剂。机械法如基因枪法和显微注射法，两者均是将 DNA 转入特定靶细胞的很好方法，但共同的缺点是易致细胞损害。基因枪法每次能转染细胞的数量有限，显微注射法非常精确，但需要熟练的操作技术。

9.1.1 磷酸钙转染技术

【实验原理】

磷酸钙转染技术，简便高效，是最早应用的 DNA 转染法之一。转染的基本原理是 DNA 和磷酸钙（$CaPO_4$）形成 DNA-$CaPO_4$ 共沉淀物，吸附于细胞的表面，利用细胞的吞噬机制，使 DNA 进入细胞，随即进入核内，插入细胞基因组内并在细胞内表达。磷酸钙转染技术用于培养细胞，其转染效率与细胞的种类及接种细胞的密度密切相关。一般来说，增殖快的细胞，接种细胞数应适当减少。转染时细胞密度在 40%～70% 为宜，转染效率可达 10%～30%。下述方法以 NIH3T3 细胞为例。

【实验用品】

（1）仪器与用品：CO_2 细胞恒温培养箱，高压灭菌锅等。

（2）试剂：2×Hebs（pH 7.1）缓冲液、70mmol/L Na_2HPO_4、2.5mol/L $CaCl_2$、30%（*V/V*）甘油、2×HBS（HEPES-缓冲盐水，pH 7.1，用时现配）、15%（*V/V*）甘油/Hebs（用时现配）。

2×Hebs（pH 7.1）缓冲液

①称取 2g HEPES 和 3.39g NaCl，混合并溶于双蒸水中，调整至 190ml；

②用 1mol/L NaOH 调整 pH 至 7.1（大约 2.56ml）；

③用双蒸水调整至200ml；

④用一次性0.22 μm过滤膜过滤除菌；

⑤分装储存在−20℃。

注：溶液的pH对转染效率有很大的影响。可以配制3～4种pH在7.1左右（7.05～7.15）的溶液，通过CAT或β-gal测定，选择转染效率好的溶液。

70 mmol/L Na_2HPO_4

①称取5.01g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 溶于双蒸水中，调整至200ml；

②用一次性0.22μm过滤膜过滤除菌。

2.5mol/L $CaCl_2$

①称取73.5g $CaCl_2$ 溶于双蒸水中，调整至200ml；

②用一次性0.22 μm过滤膜过滤除菌；

③分装储存在−20℃。

30%（V/V）甘油

取30ml甘油溶于双蒸水中，调整至100ml。

2×HBS（HEPES缓冲的盐水缓冲液），pH 7.1（用时现配）

500 μl　　2×Hebs（pH 7.1）

10μl　　70 mmol/L Na_2HPO_4

15%（V/V）甘油/Hebs（用时现配）

5ml　　30%（V/V）甘油

5ml　　2×Hebs（pH 7.1）

100 μl　　70 mmol/L Na_2HPO_4

（3）材料：培养细胞、真核细胞表达质粒pcDNA3-GFP。

【方法与步骤】

（1）转染前24h，在直径10cm培养皿内接种5×10^5个细胞；

（2）37 ℃，5% CO_2 培养箱内培养过夜；

（3）次日，加入DNA前2h，吸去培养液，加入新鲜无血清培养液；

（4）在5ml试管内，混匀440μl质粒DNA（10μg）和510μl 2×HBS溶液（pH 7.1）；

（5）缓慢加入50μl 2.5mol/L的 $CaCl_2$ 溶液，轻轻混匀约30s；

（6）室温静置30min；

（7）缓缓滴入培养皿内，同时轻轻摇动混匀；

（8）37℃，5% CO_2 培养箱内培养4h；

（9）吸去培养液；

（10）用4ml无血清培养液洗2次；

（11）加入1.5ml，15%（V/V）的甘油/ Hebs溶液；

（12）室温静置3min，吸去培养液；

（13）用4ml无血清培养液洗2次；

（14）加入10ml新鲜完全培养液；

（15）37℃，5% CO_2 培养箱内培养24～48h。

【观察与结果】

根据基因的不同，采用不同的方法鉴定转染的成功率，最常用的方法是直接荧光显微镜观察或免疫细胞化学染色。

【注意事项】

（1）DNA 的制备方法及质量对转染效率有很大影响。用氯化铯密度梯度离心法进行 DNA 制备纯化，最好纯化 2 次，再经过 Sepharose 4B 过柱，乙醇沉淀，可提高转染效率。在 10cm 的培养皿中可制备 10～30μg 的环状 DNA。目前，有许多公司生产各种各样的 DNA 制备试剂盒，方便简单，可以应用。

（2）溶液以仅呈现浑浊为适度。

（3）加入所有 DNA-$CaPO_4$ 沉淀物，并使之均匀覆盖在细胞表面。

（4）甘油休克步骤可以省略。

（5）因细胞种类不同，室温静置时间不同，但必须严格控制时间。

9.1.2 脂质体转染技术

【实验原理】

脂质体（lipofection）转染法可以达到瞬间而又稳定的基因转染效果。脂质体转染法可用于双链 DNA、mRNA 及双链 RNA 的基因转染。脂质体法和磷酸钙法有许多相同之处，但是根据被转染细胞的不同，DNA 质粒的用量有所不同。脂质体法的 DNA 质粒的用量比磷酸钙法少，而且脂质体法与磷酸钙法相比引起细胞损害较轻。它操作简单，可用于多数量样本的转染。脂质体转染法的转染效率是磷酸钙法的 5～10 倍。脂质体转染法能够达到瞬间而又稳定的效果。下述方法以 NIH3T3 细胞转染为例。

【实验用品】

（1）仪器与用品：CO_2 细胞恒温培养箱、高压灭菌锅等。

（2）试剂：Lipofectin^{TM} 试剂（Invitrogen 公司，4℃保存，避免－20℃）、Opti-MEMI^{R}（Invitrogen 公司，也可用不含血清的 DMEM 代用）、DMEM 培养基、胎牛血清（FCS）。

（3）材料：培养细胞，真核细胞表达质粒 pcDNA3-GFP。

【方法与步骤】

（1）提前 18～24h 将 NIH3T3 细胞以 1～2×10^5 密度/孔接种于 6 孔培养皿中；

（2）按每孔配制转染试剂复合物；

①把 1～4μg 质粒 DNA 稀释在 100μl Opti-MEMI

②把 2～20μl 的 Lipofectin 试剂稀释在 100μl Opti-MEMI 中，室温放置 30～45 min。

③把稀释的 DNA 与稀释的 Lipofectin 试剂轻轻混匀（共约 200μl，避免震荡）。室温放置 15～30min。

（3）移去细胞培养基，用不含血清的 DMEM 清洗细胞 2 次，除去血清残余；

（4）加 800μl 的 Opti-MEMI 到混匀好的 200μl 转染试剂复合物中轻轻摇动混匀，并加入到细胞中；

（5）放入 37℃，5%CO_2 培养箱内孵育 4～5h；

(6) 再加入1ml的含20%胎牛血清的DMEM继续在培养箱放置24～72h；

(7) 分析照相。

【观察与结果】

根据基因的不同，采用不同的方法鉴定转染的成功率，最常用的方法是直接荧光显微镜观察或免疫细胞化学染色。

【注意事项】

(1) 高浓度的DNA液体和Lipofectin液体直接混合时，可以引起模糊的沉淀物，所以务必事先将它们分别稀释后再混匀。

(2) 对于NIH3T3细胞1×10^5～2×10^5密度/孔接种于6孔培养皿中，DNA质粒的最佳量是4μg。

(3) 不同的Lipofectin™（Invitrogen公司）批号会影响转染的效果，所以转染前应核对批号。

(4) 血清中含有带负电荷的物质（如：硫酸基等）可以抑制脂质体在细胞膜上吸附，所以转染时要选用不含血清的培养液。Opti-MEMI含有L-谷氨酰胺及生长因子等物质，是减低血清的培养液。

(5) 加入混合好的转染液时，应该一滴一滴地加入细胞培养盘内。

(6) 预备细胞时，要根据NIH3T3细胞培养的条件，选择适宜的培养条件。

（单良　李炳生）

9.2 基因在细胞中表达的检测技术

细胞的一切生命活动，都是基因表达的反映。检测细胞内基因功能的状态，是从分子水平探讨细胞生命活动规律的重要手段。细胞内基因信息表达的流向是：基因（DNA）→信使RNA（mRNA）→蛋白质分子，检测不同的对象应采用不同的检测技术。本节将介绍最常用的DNA印迹杂交法、RNA印迹杂交法、蛋白印迹杂交法和绿色荧光蛋白基因转染及检测方法。

9.2.1 DNA印迹杂交法

Southern印迹法（Southern blot）是Southern于1975年建立的分析基因组DNA的方法。通过将固定于支持膜上的单链DNA与化学、放射性标记的探针进行杂交，从而对特异DNA片段进行定位分析、相对分子质量测定等分析。

【实验原理】

基因组DNA经限制性内切酶酶解、凝胶电泳分离，使DNA片段按相对分子质量大小进行分离。分离后的DNA片段经碱处理使之变性为单链DNA片段，将单链DNA片段转移至支持膜（常用硝酸纤维素滤膜或尼龙膜）上。经过干燥或紫外线照射处理，使单链DNA片段与支持膜结合而固定在膜上，然后与^{32}P、^{35}S或地高辛等标记的DNA探针进行杂交，经放射自显影或化学发光等对特定位置上显现的特异DNA片段进行分析。这种方法与其他印迹法原理相似，将电泳分离和杂交技术结合起来，进行特异

DNA 片段的检测、定位以及相对分子质量测定。通常以已知相对分子质量的 DNA 片段为标准，精确测量各标准片段与电泳原点之间的距离。以 DNA 的 lg kb 为纵坐标，移动距离（cm）为横坐标，连接各已知条带相应的点，得到一条标准曲线。然后测量未知条带（放射自显影后获得的特异片段）的移动距离，在标准曲线上找出相应的 lg kb 值，以此计算其相对分子质量大小。

地高辛（Digoxigenin，Dig）又称异羟基洋地黄毒苷配基，是类固醇半抗原，其抗体与其他任何固醇类似物，如人体中的性激素等无交叉反应。地高辛配基标记于脱氧尿嘧啶三磷酸核苷（dUTP）上形成 dig－11-dUTP。待标记的寡核苷酸经末端转移酶催化与 Dig-dUTP 连接，成为地高辛标记的探针。标记探针通过酶联免疫法、或耦联荧光素的抗体复合物结合，加入酶的反应底物或显色底物，使杂交部位显色或产生荧光以达到检测目的。本实验采用地高辛标记探针的方法进行 DNA 片段的检测。

【实验用品】

（1）材料：基因组 DNA，硝酸纤维素滤膜或尼龙膜，电泳分离 DNA 的琼脂糖凝胶。

（2）试剂：10×酶切 buffer，限制性内切酶，0.5mol/L EDTA，饱和酚，氯仿，无水乙醇，TE 缓冲液，地高辛标记试剂盒，10mg/ml 溴化乙锭；酸变性液：0.25mol/L HCl，用分析纯的盐酸（12mol/L）稀释；碱变性液：0.5mol/L NaOH，1.5mol/L NaCl（pH13.1）；中和液：0.5mol/L Tris. HCl（pH7.5），1.5mol/L NaCl；20×SSC：0.3mol/L 柠檬酸，3mol/L NaCl，pH7.0；10×SSC 和 2×SSC：用双蒸水稀释 20×SSC 储存液。

（3）器材：电热真空干燥箱、大方瓷盘、带盖方盘、玻璃板、滤纸、吸水纸、保鲜膜、蜡膜（parafilm）、一次性手套、刀片、刻度吸管、镊子、剪刀、1kg 重物等。

【方法与步骤】

注：要戴手套操作！

1. 探针标记

（1）取 0.2 ml 的 EP 管于冰上，依次加入 dsDNA 寡核苷酸片段 1μl，5×标记用缓冲液 4μl，Dig-ddUTP 溶液 1μl，$CoCl_2$ 溶液 4μl，加无菌双蒸水 9μl，最后加入末端转移酶 1μl 后混匀。

（2）上述反应液，于 37℃反应 1h，加入 2μl EDTA（0.2 mol/L），终止反应，加无菌双蒸水 3μl 至终体积 25μl，得到标记探针。探针稀释 10 倍后备用。

2. 基因组 DNA 的限制性酶切

一般 Southern 杂交每一个电泳通道需要 10～30μg 的 DNA。为保证消化完全，一般用 2～4U 的酶消化 1μg 的 DNA。消化的 DNA 浓度不宜太高，以 0.5μg/μl 为好

DNA（1μg/μl）	20μg
10×酶切缓冲液	5.0μl
限制性内切酶（10U/μl）	5.0μl

加 ddH_2O　　　　　　　　　　至 50μl

在最适温度下消化 1～3h。消化结束时可取 5μl 电泳检测消化效果。

3. 电泳检测

(1) 消化后的 DNA 加入 1/10 体积的 0.5mol/L EDTA 终止消化。用等体积酚抽提、等体积氯仿抽提纯化后，上清用 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA，最后用少量 TE 溶解 DNA（参见 DNA 提取方法，但离心转速要提高到 15 000r/min，以防止小片段 DNA 的丢失）。

(2) DNA 片段经 0.8%琼脂糖凝胶电泳分离后，紫外灯下观察电泳效果。在胶的一侧放置一把刻度尺，拍摄照片。正常电泳图谱呈现一连续的涂抹带，照片摄入刻度尺是为了以后判断信号带的位置，以确定被杂交的 DNA 长度。

4. 凝胶处理

(1) 凝胶照相后，切去包括标记带在内的多余部分，将凝胶的一角（点第一个样品的一侧）切去作为标记，便于定位。精确测量凝胶大小，然后将凝胶放入一个方形瓷盘中；

(2) 变性：将凝胶浸泡于适量的碱变性液中，室温下变性 30min，期间更换变性液一次，不断地轻轻摇动（如果先进行酸变性，则凝胶中溴酚蓝的颜色由黄变蓝）。对于较大的 DNA 片段（如大于 15kb），凝胶可在碱变性前用 0.25mol/L HCl 预处理 10min，使 DNA 片段脱嘌呤（凝胶中溴酚蓝的颜色由蓝变黄）后再进行碱变性；

(3) 中和：移去瓷盘中的碱性溶液，用双蒸水漂洗凝胶两次，然后浸泡于适量的中和液中，室温下轻轻摇动 15min，更换新鲜中和液，再中和 15min。

5. 膜处理

(1) 剪下一张与凝胶面积相同的硝酸纤维素膜（NCP）或尼龙膜（NL）。注意 NCP 也要剪去一角且不可用手触摸，粘有油腻的膜不能被湿润，也不能结合 DNA。同时剪 8～10 张与 NCP 等大的干净滤纸；

(2) 将 NCP 与 3～4 张滤纸依次漂浮于盛有双蒸水的带盖方盘中，使水自然从 NCP 的下面向上浸润，待其完全浸湿后，连同浸湿的滤纸一起浸入于转移液中浸泡5～10min。

注意：在蒸馏水中，如 NCP 表面有气泡时，可将其放在 65℃水浴中浸泡几分钟，仍有气泡或不能完全被湿润（膜上有白色或黄色斑块）则不能用于转移。

6. 转移

(1) 取一个较大的方形瓷盘，放一块玻璃板于盘上，盘内加转移液（6×SSC 或 10×SSC）使液面距离玻璃底面约 1～2cm，玻璃板表面盖两张预先用转移液浸润的 Whatman 3M 滤纸（也可用新华滤纸），滤纸两端浸入 SSC 转移液中，用一玻璃棒将滤纸压平，滤纸与玻璃板间不得有气泡；

(2) 将琼脂糖凝胶翻转（样品孔朝下）后置于上述铺有 Whatman 3M 滤纸的平台上（注意：两者之间不能有气泡）；

(3) 用 parafilm 蜡膜将凝胶四周平台上裸露的滤纸封严，防止在转移过程中因短路（转移液直接从盘中流向吸水纸而不经过凝胶）使转移效率降低，甚至转移失败；

(4) 将处理好的 NCP 小心地覆盖在凝胶上（滤膜的光泽面即标有 N. C 字样的一面朝向凝胶），NCP 的一端与凝胶的上样孔对齐，切去的一角与凝胶切角的位置对齐；

注：滤膜与凝胶之间不能有气泡，且 NCP 一旦与凝胶接触即不可再移动，因为从接触的一刻起，DNA 已开始转移。

(5) 将预先用转移液浸润过的与 NCP 大小相同的 Whatman 3M 滤纸覆盖在硝酸纤维素膜上，排出滤纸与膜之间的气泡；

(6) 再放几张相同大小的干滤纸和一叠厚约 10～15cm 的吸水纸于滤纸上，顶部压一块玻璃板和 1kg 左右的重物；

(7) 静置 12～15h 使其充分转移，其间换吸水纸 1～2 次。转移液在吸水纸的虹吸作用下从盘中转移到吸水纸上，从而带动 DNA 从琼脂糖凝胶中转移到 NCP 上；

(8) 转移结束，移去吸水纸和滤纸，在 NCP 上用铅笔标上点样孔的位置。将 NCP 浸泡在 2×SSC 中 5min 以去除琼脂糖碎块。将膜放置于一张干燥的新鲜滤纸上；

(9) 在紫外灯下观察凝胶和 NCP 膜，以了解 DNA 转移的情况。在紫外灯下凝胶不显示荧光，NCP 膜呈橘红色，并可见到条状的 DNA 带；

(10) 把 NCP 置于两层干燥新鲜的滤纸间，真空下 120℃烘烤 30 min，使 DNA 比较牢固地固定于 NCP 上；

(11) 此 NCP 既可直接用于杂交，亦可用塑料薄膜密封，置－20℃冰箱保存备用。

【注意事项】

(1) 操作时戴手套，严禁用手接触凝胶和硝酸纤维素膜；

(2) 转移时，滤纸与膜、膜与凝胶、凝胶与滤纸桥之间均不能有气泡，否则影响 DNA 转移；

(3) 凝胶易碎，操作时应格外小心；

(4) 硝酸纤维素膜上的 DNA 固定非常重要，固定不好时 DNA 在杂交过程中会脱落下来；烤膜温度过高，膜脆性增加，易碎；

(5) 大片段 DNA 转移效率低，可在碱变性前用 0.25mol/L HCl 浸泡凝胶 10～15min，使 DNA 分子脱嘌呤或用短波（260mm）紫外光照射 10～20min 后再行碱变性、转移，以提高大片段 DNA 的转移效率；

(6) 转移液中盐离子浓度对转移有较大影响。10×SSC 条件适中，能有效地转移 1～20kb的 DNA 片段，速度也比 20×SSC 快，比较常用。若转移 DNA 片段较小，则宜选用 20×SSC。因此应根据不同目的选择适当的转移液。

（胡晓燕　苑辉卿）

9.2.2 RNA 印迹杂交法（Northern blotting）

【实验原理】

RNA 印迹法是以探讨特异性的基因表达（信使 RNA）为目的的技术。此法是一种

将 RNA 从琼脂糖凝胶中转印到硝酸纤维素膜上的方法，用于检测分子的特定序列。经变性处理后的 RNA 有利于在转印过程中与硝酸纤维素膜结合，然后与其互补的放射性 RNA 探针杂交，经自显影来检测特异结合的探针。通过此法来测定细胞内某种 mRNA 的变化，从而了解某基因在细胞或组织转录水平的调节。RNA 印迹法根据变性试剂的不同，可以分为 Formaldehyde 和 Glyoxal/DMSO 两种方法。本节以甲醛为例来说明。

【实验用品】

（1）仪器与用品：电泳槽、盛胶槽、梳子、水溶槽、烘烤箱、琼脂糖、稳压直流电源、硝酸纤维素膜等。

（2）试剂：1% 琼脂糖（agarose）溶液、20×SSC 溶液、10×MOPS、甲醛（新鲜制备）、RNA 印迹杂交液、RNA 分子质量标准参照物。

a. 1% 琼脂糖（agarose）溶液

琼脂糖	1.5g
10×MOPS	15ml
DEPC 水	110ml

b. 10×MOPS

MOPS	41.854g（最终浓度 0.2mol/L）
NaOAC	6.804g（最终浓度 50mmol/L）
EDTA	3.722g（最终浓度 10mmol/L）

c. 甲醛（新鲜制备）

①在 37℃下融化。

②将其分装在 50ml 试管中。

③迅速地将分装的试管液放在液氮上（为了结晶化，放入液氮的时间少许即可）。

④将试管放入冰中过夜（4℃）。

⑤弃之液态水层，将结晶化层在－20℃下保存，以方便使用。

d. RNA 印迹杂交液（50ml）

甲醛	25ml
20×SSC（过滤后）	12.5ml
0.5mol/L 磷酸钠（pH6.5～6.9）	5ml
鲑鱼精子 DNA（4mg/ml）	0.5ml
100×Dehardt's	2ml
DEPC 水	5ml

（3）材料：哺乳动物培养细胞或动物的组织。

【方法与步骤】

（1）将溶解的 1%琼脂糖冷却至 60℃，然后加入 25ml 甲醛；

（2）充分混合均匀后，倒入盛胶槽（15cm×15cm），插上梳子，置室温至少 30min 使其凝固；

（3）在 1.5ml 的试管中，加入含全 RNA（20μg）或 poly（A）RNA（1μg）3.5μl 的水溶液；将下列变性溶液逐步加入 1.5ml 的 EP 管中；

甲醛　　　　5μl

10×MOPS　1.5μl

甲醛　　　　2μl

注：将标记片段分子与RNA样品同样处理。

(4) 将样品放入65℃的水浴槽中加热变性后，放入冰浴盒中快速冷却；

(5) 加入3μl 5倍dye-glycerol；

(6) 将RNA样品加入琼脂糖凝胶的样品槽中；

注：将凝胶用EB染色时，至少要用一组样品。在可能情况下，可用两组样品电泳，一组样品直接观察RNA染色，而另一组则直接进行RNA印迹转印。

(7) 盖上电泳槽盖，用1×MOPS溶液作为电泳缓冲液，以100V进行电泳3h；

注：追踪染剂（BPB）行进至胶片的2/3程度即可停止电泳。

(8) RNA分子转印：将凝胶中RNA分子转印到硝酸纤维膜（nitrocellulosemembrane），如图9-1所示，转移时间多为过夜；

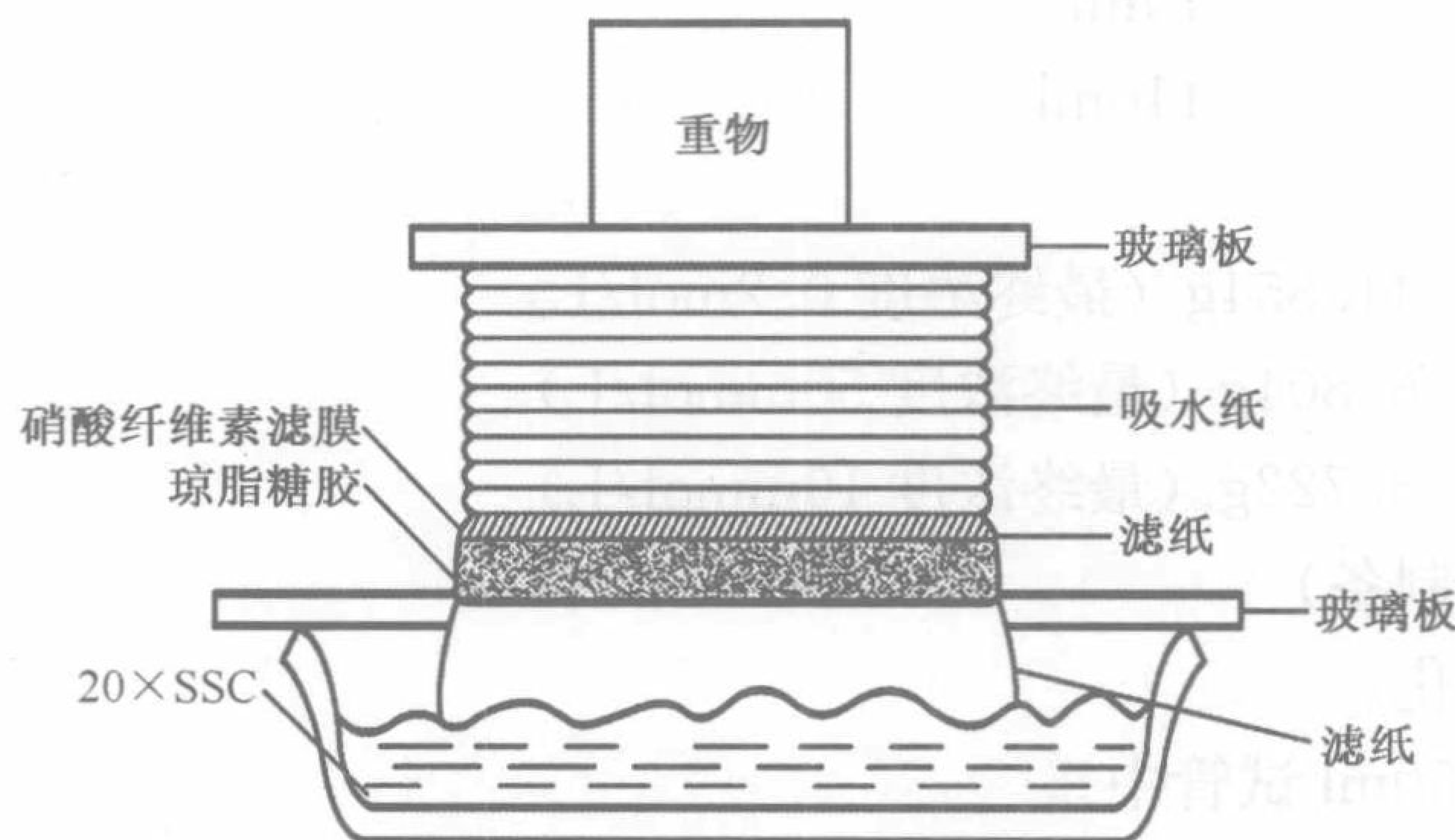


图9-1　RNA分子转印

注：将硝酸纤维膜在水中浸泡后，用20×SSC将其充分地浸泡后使用（大约5min）。将滤纸和吸水纸剪裁成与胶片同样大小或较胶片稍小，重叠在一起，并去掉滤纸与玻璃板之间的气泡。

(9) 转移过程操作

①将硝酸纤维膜放在两张3M Whatman滤纸中，将其放入80℃真空烘烤箱烘烤2h，亦可将干燥的膜以紫外光进行交联；

②将膜用杂交液湿透后，放在一个可封口的塑料袋中，然后加入10ml杂交溶液，并将其封口；

③将样品袋放在42℃水浴槽中，预杂交2h；

④完全弃去袋中的液体，加入10ml含有标记探针的新鲜的杂交溶液；

注：在加入袋中前，用沸水将含有探针的杂交溶液加热3min后使用。

⑤置于42℃水浴槽中杂交过夜；

⑥次日，将杂交袋切开一个小口，小心并安全地弃之杂交液；

⑦将膜从袋中取去，在2×SSC和0.1%SDS溶液中清洗一次；

⑧用200ml 2×SSC和0.1%SDS溶液清洗膜3次，每次10min（室温）；

⑨用 200ml 0.1×SSC 和 0.1%SDS 溶液清洗膜 3 次，每次 20min（50℃）；

⑩将膜从洗液中取出，用保鲜膜包住；

⑪将 X 射线底片覆盖于膜上，置入曝光夹中，在−70℃温度下曝光过夜；

⑫将底片冲洗并记录结果。

注：将膜上的探针去除，室温晾干干燥后，可以保存几个月。

【观察与结果】

在曝光底片上可看到与特异性的探针结合的特定表达清晰的显影条带，见图 9-2。

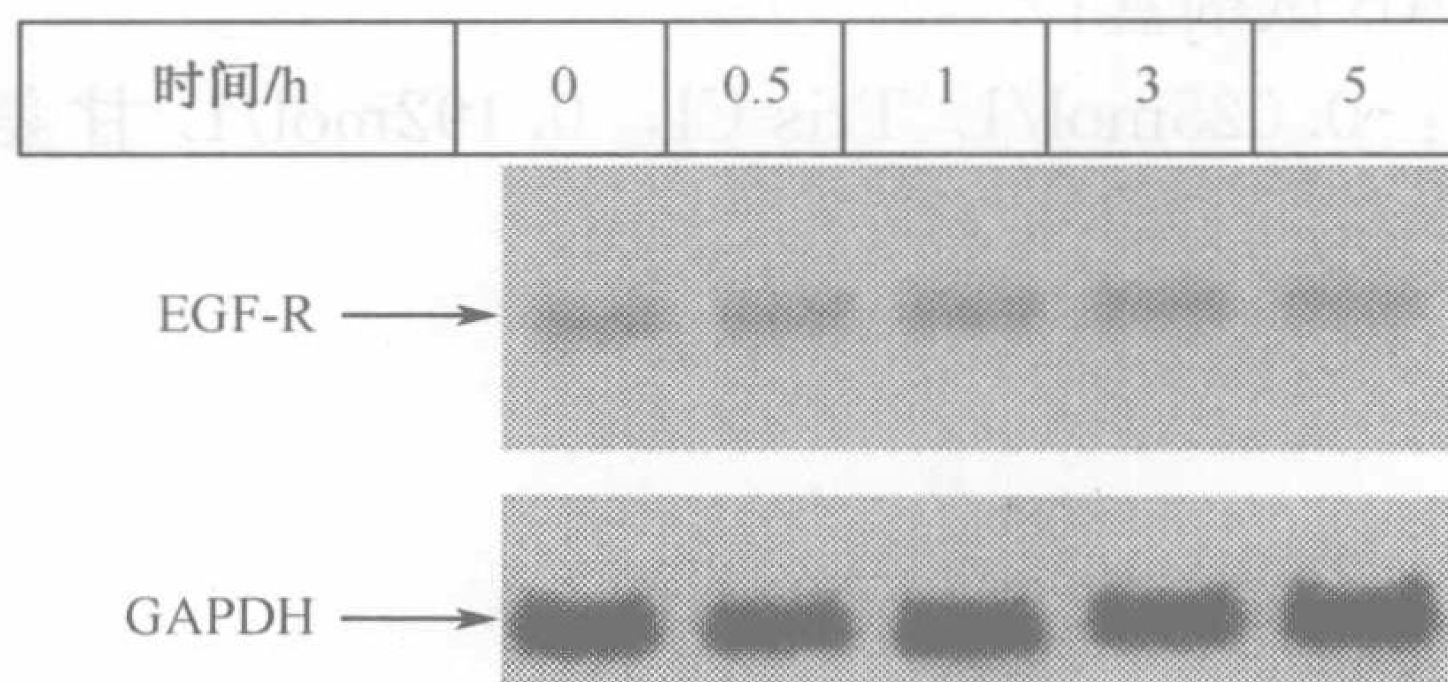


图 9-2　EGF 处理不同时间培养人黑色素细胞 EGF 受体表达的结果

【注意事项】

（1）保持所有使用的器具、试剂以及实验环境无 RNA 酶。

（2）将实验用具用蒸馏水清洗干净后，加热干燥。

（3）将电泳槽等不能加热的用具洗净后，用 5%H_2O_2 浸泡 1h，然后用 DEPC 水洗净。

（4）将 Milli Q 水，高压灭菌后使用。试剂可用高压灭菌，不能使用高压灭菌用品应通过过滤灭菌。

（5）染色方法：电泳结束后，在 250ml 水中加入 5μl EB，小心地将胶放入其中染色 15min（小心的摇动），让胶脱色 15min，2 次（小心地摇动）。在脱色过程中，如果 RNA 条带显示不明显，可加长曝光时间（1h～过夜），但是在实验过程中应注意避免 RNA 降解。如果由于各种原因无法避免 RNA 降解，此步亦可省略。这是因为凝胶预先用 20×SSC 浸泡或 RNA 的 EB 染色，将降低 RNA 转移效率。

（侯陵　李炳生）

9.2.3　蛋白印迹杂交法

【实验原理】

蛋白质印迹（western blotting）是通过 SDS-PAGE 电泳区分样品中不同的蛋白质组分，然后用电转移法将电泳凝胶中的蛋白质组分转移到硝酸纤维素膜或其他膜上，然后以特定的亲和反应、免疫反应或结合反应及显色系统分析蛋白质。本实验中印迹转移完成后，采用辣根过氧化酶法检测目标蛋白质。

【实验用品】

1. 器材

电泳仪、电转仪、电泳槽、暗盒、X 射线胶片、微量加样器、加样枪头等。

2. 试剂

(1) 人 IgG 免疫兔的抗血清（一抗），辣根过氧化酶-羊抗兔 IgG（二抗）；

(2) PBS 缓冲液：NaCl 8g，KCl 0.2g，KH_2PO_4 0.24g，$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9g，加蒸馏水至 1000ml，pH7.4；

(3) PBS-T 缓冲液：PBS 缓冲液加 0.05% 吐温-20；

(4) 封闭液：0.5%BSA（用 PBS 缓冲液配制）；

(5) 底物溶液：DAB 试剂盒；

(6) 转移缓冲液：0.025mol/L Tris-Cl，0.192mol/L 甘氨酸，20% 甲醇，pH 为 8.3。

3. 材料

培养细胞或组织。

【方法与步骤】

1. 培养细胞的制备

将 HeLa 细胞按 1×10^6 个/孔接种于 24 孔板，37℃，5%CO_2 培养箱中培养 24h，镜下观察细胞达到 70%密度时即可进行抗原粗提液制备。

2. SDS-PAGE 电泳

将待检测的抗原粗提液、纯化过程中的样品或纯化后的样品以及蛋白质相对分子质量标准等用 SDS-PAGE 分离。

3. 将蛋白质转移到硝酸纤维素薄膜上

(1) 准备转移缓冲液；

(2) 切割与胶尺寸相符的硝酸纤维素薄膜，并用转移缓冲液浸湿，放置 15min 直到没有气泡；

(3) 切割 8 张普通滤纸，其大小与胶尺寸大小相符，并将其浸泡在转移缓冲液中（与硝酸纤维素薄膜分开浸泡）；

(4) 电泳后，切取有用部分的胶，并很快地在转移缓冲液中洗涤；

(5) 打开蛋白质转移槽的盖板，依次放入：

① 4 张用转移缓冲液浸泡过的滤纸；

② 用转移缓冲液洗过的胶，并小心地赶走滤纸和胶之间的所有气泡；

③ 放上硝酸纤维素膜；

④ 另 4 张用转移缓冲液浸泡过的滤纸；

(6) 小心地合上转移槽的盖板；

(7) 插入电极，注意正负极方向（硝酸纤维素膜面向阳极），打开电泳仪开关，电流为 0.8mA /cm^2（胶的面积），时间为 1.5～2h；

(8) 转移结束后打开盖板取出硝酸纤维素薄膜。

4. 免疫印迹膜的处理

(1) 用 PBS 缓冲液洗膜 5～10min；

(2) 将膜用封闭溶液封闭，用摇床轻摇，37℃，60min；

(3) 用 PBS 缓冲液洗膜 3 次，每次 10min；

(4) 将膜置于第一抗体溶液（1∶10）中，置摇床上轻摇，37℃摇动 2h 或 4℃过夜；

(5) 去掉第一抗体溶液，并用 PBS 洗膜 3 次，每次 10min；

(6) 将膜置于辣根过氧化酶-羊抗兔 IgG 溶液（1∶500）中，37℃轻摇 2h；

(7) 去掉辣根过氧化酶-羊抗兔 IgG 溶液，并用 PBS-T 洗膜 3 次，每次 10min；

(8) 最后用 PBS 溶液洗；

(9) 加底物溶液反应 2～10min，至抗原区带显色清楚为止；

(10) 用去离子水洗涤，以终止反应。将膜夹在滤纸间，干燥。置暗处保存。另外，加底物溶液的显色反应也可用增强化学发光法（enhanced chemiluminescence，ECL）代替，以增加其灵敏度，即将膜经 ECL kits 处理后，用放射自显影在 X 射线片上留下清晰的图像。

【结果与观察】

膜上相应的泳道出现条带（图 9-3）。

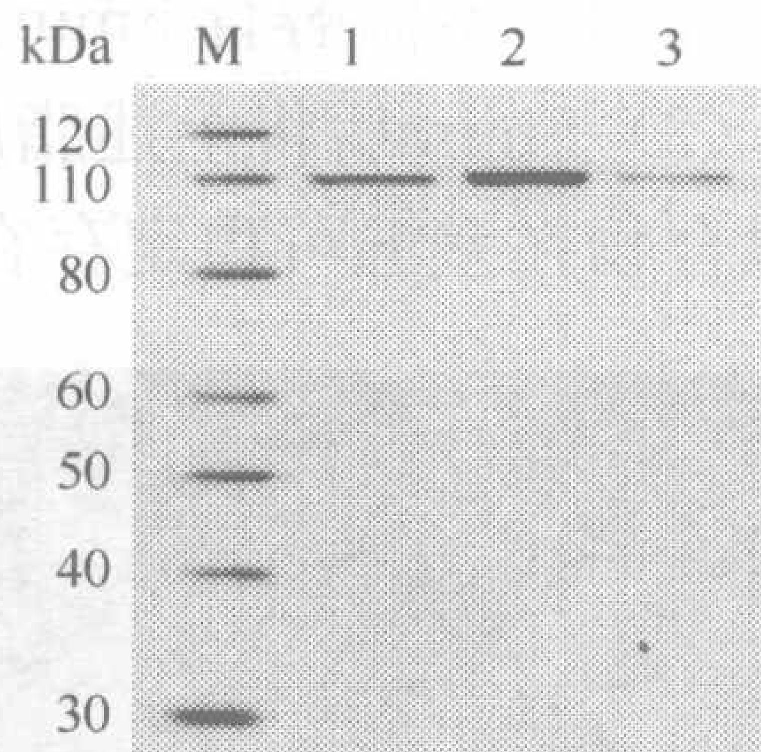


图 9-3　经处理后蛋白质条带

1. 阴性对照；2. 阳性对照；3. 检测样品

【注意事项】

(1) 一抗、二抗的稀释度、作用时间和温度对不同的蛋白质要经过预实验确定。

(2) 底物溶液要新鲜配制。

(3) 一些试剂对人体有害，如丙烯酰胺、放射性同位素等，注意安全。

(4) 实验中应戴手套操作，避免样品污染。

（胡晓燕）

9.2.4　绿色荧光蛋白基因转染及检测

将绿色荧光蛋白（GFP）基因导入细胞中表达，在荧光显微镜下经紫外光或蓝光激发后可产生绿色荧光而被观察到。该技术主要用于研究基因表达调控、细胞分化、胚胎发育、蛋白质在活体内的定位等。

将外源基因导入哺乳动物细胞的方法很多，主要有脂质体法、电转法、钙盐法等。本实验采用脂质体方法进行 GFP 基因转染。

【实验原理】

脂质体是由磷脂形成的脂质双层膜，与细胞质膜的结构相近。阳离子脂质体表面带正电荷，能与核酸的磷酸根通过静电作用，将 DNA 分子包裹入内，形成 DNA-脂复合体。复合体也能被表面带负电荷的细胞膜吸附，再通过融合或细胞内吞作用进入细胞，从而将与脂质体结合的 DNA 释放至细胞内。如果是质粒 DNA 则在细胞内表达，可进

行基因调控、功能研究等。

脂质体法具有很多优点，对转染的核酸类型和分子质量有很高的包容性，细胞毒性小，也可以用于体内的基因转染。此外，该法操作简便，转化效率比较高，可以用于瞬时转染，也可以用于永久表达系的建立。

【实验用品】

（1）器材：超净工作台、CO_2 培养箱、倒置荧光显微镜、细胞培养常规用品（35ml 培养皿、离心管、吸管、移液管、微量加样器、加样头、细胞计数板等）。

（2）试剂：DMEM 培养液（含 10%小牛血清、庆大霉素）、0.25%胰蛋白酶、脂质体 lipofectamine2000。

（3）材料：HeLa 细胞株和 pEGFP-N1 表达质粒（增强型绿色荧光蛋白表达质粒）。

【方法与步骤】

（1）培养细胞的制备：将 HeLa 细胞按 1×10^6 个/孔接种于 24 孔板，37℃，5% CO_2 培养箱中培养 24h，镜下观察细胞达到 70%密度时即可进行转染。

（2）取 pEGFP-N1 质粒 0.8μg，溶于 50μl 无血清无抗生素 RPMI 1640 培养基中；取脂质体 Lipofectamine™ 2000，2μl 溶于 50μl 无血清无抗生素 RPMI 1640 培养基中，轻柔混匀，室温孵育 5min。

（3）5min 后将上述脂质体和质粒混合，轻柔混匀后室温静置 20min（脂质体和质粒混合物在室温可稳定存在 6h）。

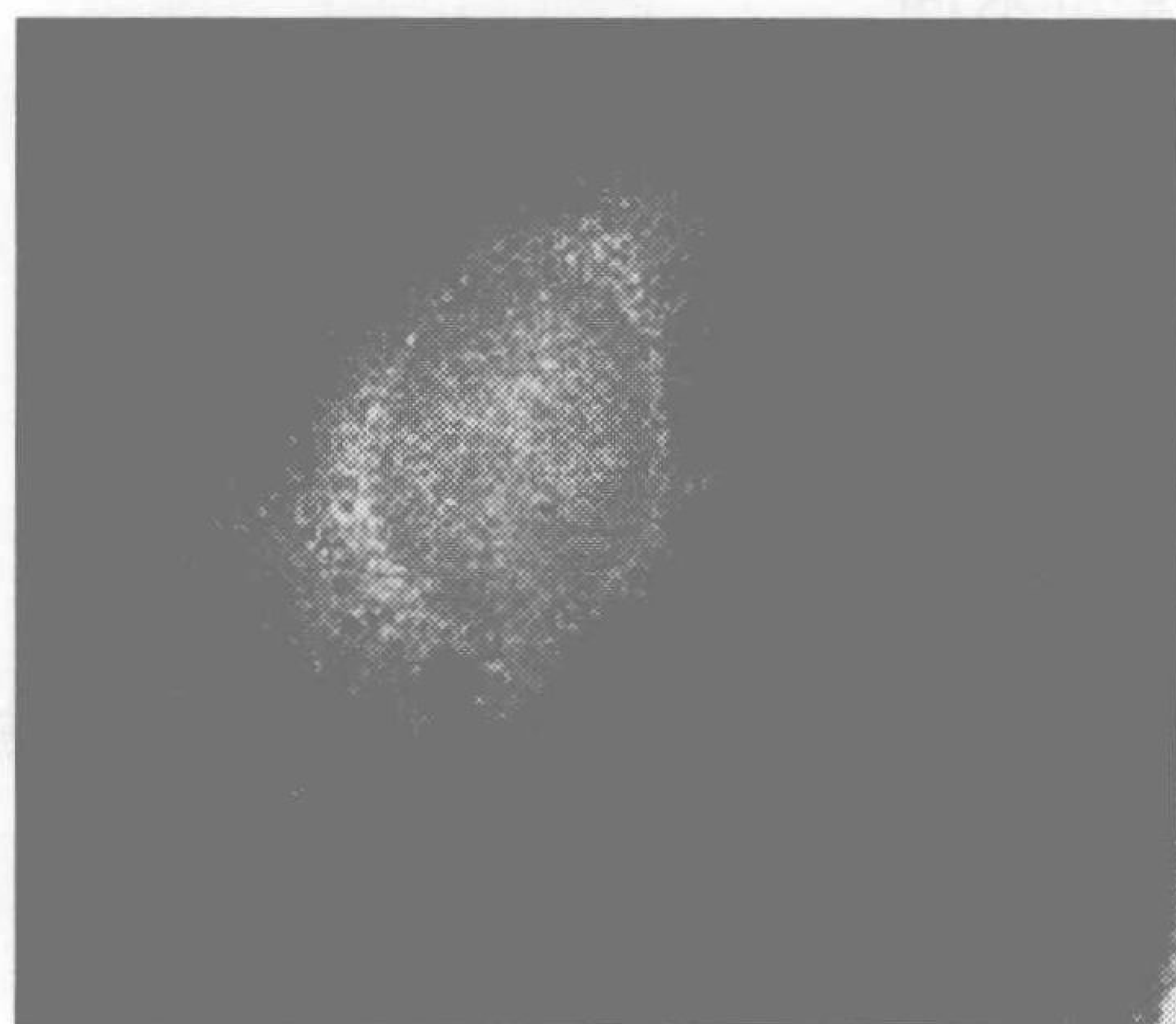


图 9-4　GFP 基因转染 HeLa 细胞后发出明亮的绿色荧光

（4）弃 24 孔板中的旧培基，换用无血清无抗生素 RPMI 1640 培养基洗涤细胞一次，将脂质体和质粒混合物按 100μl/孔 加入细胞中，混匀后置细胞培养箱中培养，混匀时动作一定要轻柔。

（5）转染后 4～6h，更换含抗生素和血清的 RPMI 1640 的常规培基，37℃，5% CO_2 培养箱中继续培养 18～20h 可以进行观察。

【结果与观察】

用倒置荧光显微镜在蓝光激发下对 GFP 进行实时观察，可见部分 HeLa 细胞发明亮的绿色荧光（图 9-4）。

（苑辉卿）

参 考 文 献

Ausubel F M et al. 2003. Current Protocol in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.

Felgner P L et al. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc Natl Acad Sci USA, 84: 7413

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1998. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press

第 10 章　哺乳动物基因敲除技术

基因敲除技术是 19 世纪 80 年代后半期应用 DNA 同源重组原理和胚胎干细胞（ES 细胞）分离以及体外培养技术发展起来的一门新技术，是指对一个结构已知但功能未知的基因，从分子水平上设计实验，通过将该基因去除或用其他顺序相近的基因取代，然后从整体观察实验动物，推测相应基因的功能。基因敲除的路线如下：①构建重组基因载体；②用电穿孔、显微注射等方法把重组 DNA 转入胚胎干细胞中；③用选择培养基筛选重组的胚胎干细胞；④制备嵌合体小鼠；⑤基因敲除小鼠的建立。

十年多之前，研究人员从小鼠囊胚内细胞团分离出多能小鼠胚胎干细胞并确定了维持培养的条件。胚胎干细胞和内细胞团细胞有很多相似之处，尤其是它们都有形成嵌合体所有组织的能力。如果使用严格的培养条件，甚至于在许多代以后及随后的遗传学处理中，这些细胞仍可以维持胚性发育潜能。引入到胚胎干细胞的基因改造可以通过生产胚胎干细胞嵌合体遗传到种系，这样就将可以有机会改变或修饰内源性基因并在体内研究它们的功能。

10.1　常用基因打靶载体的设计原则

构建打靶载体的同源重组臂的 DNA 序列应来源于与 ES 细胞同系的小鼠，如通常采用 129/Sv ES 细胞；打靶载体常含有阳性筛选基因 neomycin 和阴性筛选基因 HSV-TK。打靶载体同源序列长度应在 6～10kb，两个同源重组臂应在 5kb 以上，至少应不小于 2kb，由于同源臂较长，一般的 PCR 技术应用受到一定的限制，因为一般 PCR 扩增过程中可能导入基因突变。打靶载体的一个同源重组臂和克隆载体之间应该设计一个单一的限制性酶切位点，以利于载体转染前的线性化。突变位点或 loxP 位点应尽可能的克隆在阳性筛选基因的附近。一般采用 Southern 印迹技术确定重组的 ES 细胞，PCR 技术在 ES 细胞筛选中也受到限制，因为没有真正的阳性对照标本；再则 PCR 扩增大片段的基因组 DNA 有一定的难度，因此阳性 ES 细胞的筛选主要采用 Southern 印迹杂交，为了便于操作，基因组同源重组区外的附近区域应该含有单一的酶切位点，并在其附近设计杂交探针。

10.1.1　*P21*（WAF1）基因打靶载体的构建

【实验原理】

P21（WAF1）是细胞周期蛋白依赖性激酶（cyclin-dependent kinase，CDK）的抑制蛋白，是细胞周期的负调控因子，能有效地引起细胞周期 G_1 期和 G_2 期阻滞，从而

在维持基因组稳定性中起作用。构建 *p21* 基因敲除小鼠对研究 *p21* 的基因功能和与其他基因的关系具有重要的意义。*p21* 基因的外显子 2 占其全部编码序列的 90%以上，理论上认为敲除外显子 2 即能够去除 *p21* 的基因的功能。

【实验用品】

（1）仪器与用品：PCR 仪、恒温水浴箱、台式高速离心机、恒温水浴摇床、核酸电泳装置等常规分子生物学仪器及可调式微量移液器等用品。

（2）试剂：基因克隆所需要的酶：*Bgl* Ⅱ、*Xba* Ⅰ、*Xho* Ⅰ、*Not* Ⅰ、T4 DNA 连接酶；地高辛 DNA 探针标记试剂盒（Roche 公司）；QEX Ⅱ琼脂糖凝胶回收试剂盒（QIAGEN 公司）；129/Sv 噬菌体基因组文库，PCR 扩增所需要的酶。

（3）材料：采用 pPNT 质粒为构建打靶载体的骨架载体，本载体含有阳性筛选基因（neomycin）和阴性筛选基因（HSV-TK），二者分别受 mPGK1 启动子的调控。

【方法与步骤】

（1）129/Sv 小鼠基因组文库杂交探针的制备：根据基因库 *p21* 基因序列，设计扩增 *p21* 第二外显子的 PCR 引物，上游引物：5′-TCTTCTGTTTCAGCCACAGGC-3′；下游引物：5′-TGTCAGGCTGGTCTGCCTCC-3′。

（2）129/Sv 小鼠尾基因组 DNA 的提取；PCR 扩增 *p21* 外显子 2 的 DNA 片段，回收 450bp 的 *p21* 基因的 DNA 片段。Roche 公司地高辛试剂盒标记 DNA 探针。

（3）129/Sv 噬菌体基因组文库杂交筛选含有 *p21* 外显子 2 的基因组 DNA 片段的重组噬菌体，扩增制备 *p21* 基因组片段。

（4）打靶载体的构建：含有外显子 2 的 *p21* 重组噬菌体携带 8kb 的 *p21* 基因组 DNA 片段，其中 6kb DNA 片段位于外显子 2 的下游，2kb DNA 片段位于外显子 2 的上游。

（5）下游同源重组臂的制备：*Bgl* Ⅱ和 *Xba* Ⅰ酶切重组噬菌体 DNA，获得 6kb 的 *p21* 基因 DNA 片段，pPNT 载体以 *Bam*H Ⅰ和 *Xba* Ⅰ酶切，回收大片段，T4DNA 连接酶将 6kb 的 *p21* 片段克隆在 pPNT 载体内。

（6）上游同源重组臂的制备：*Xho* Ⅰ和 *Not* Ⅰ酶切重组噬菌体 DNA，回收 2kb 的 p21 上游同源重组臂，插入 *Xho* Ⅰ和 *Not* Ⅰ酶切的重组 pPNT 质粒中，获得 *p21* 基因的打靶载体。

（7）重组打靶载体的线性化：重组 pPNT 含有阳性筛选基因 neomycin 表达盒和阴性筛选基因 *HSV-TK* 的表达盒，在 neomycin 表达盒的两侧为上下游同源重组臂（图 10-1、图 10-2）。采用 *Not* Ⅰ将重组 pPNT 线性化，采用 QIAGEN QEX Ⅱ琼脂糖凝胶回收试剂盒制备可用于基因转染的 DNA 片段。

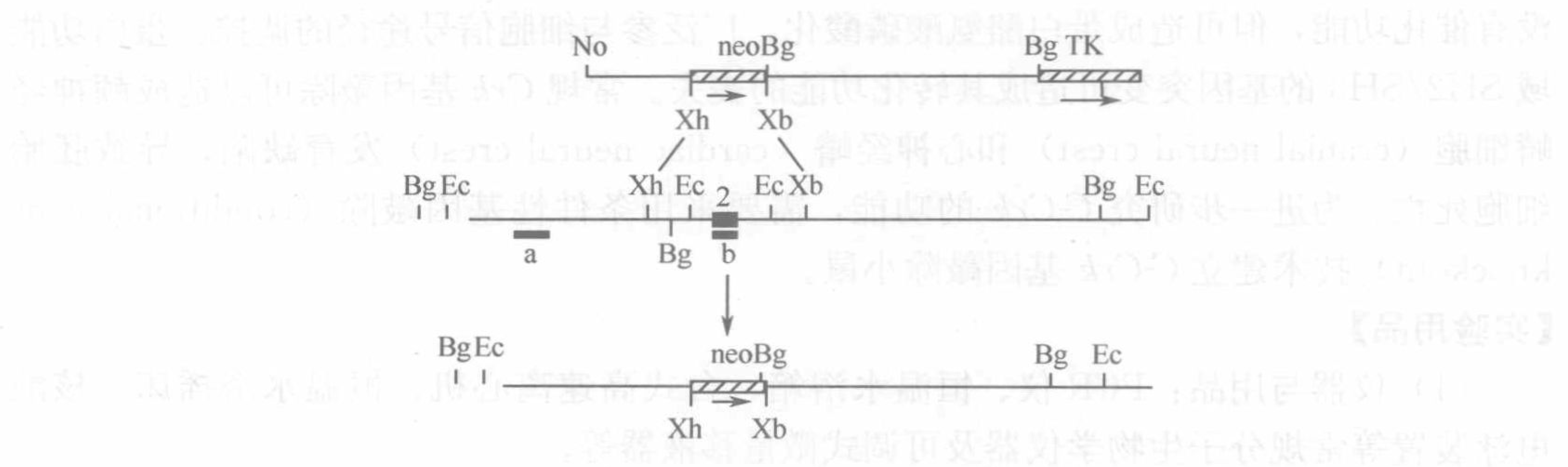


图 10-1　打靶载体和基因同源重组的示意图

打靶载体包含一个 8kb 的 *p21* 基因组序列，其中 *Xho* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ之间插入了一个 PGK-Neo 表达盒，对应 3kb 的 *p21* 基因组序列。斜体框下方箭头标示 PGK-Neo 和 PGK-tk 的基因转录方向，短横线 a 和 b 表示探针的结合位置，短横线 b 上方对应的黑色实体框表示 *p21* 基因的外显子 2（Deng et al. 1995）

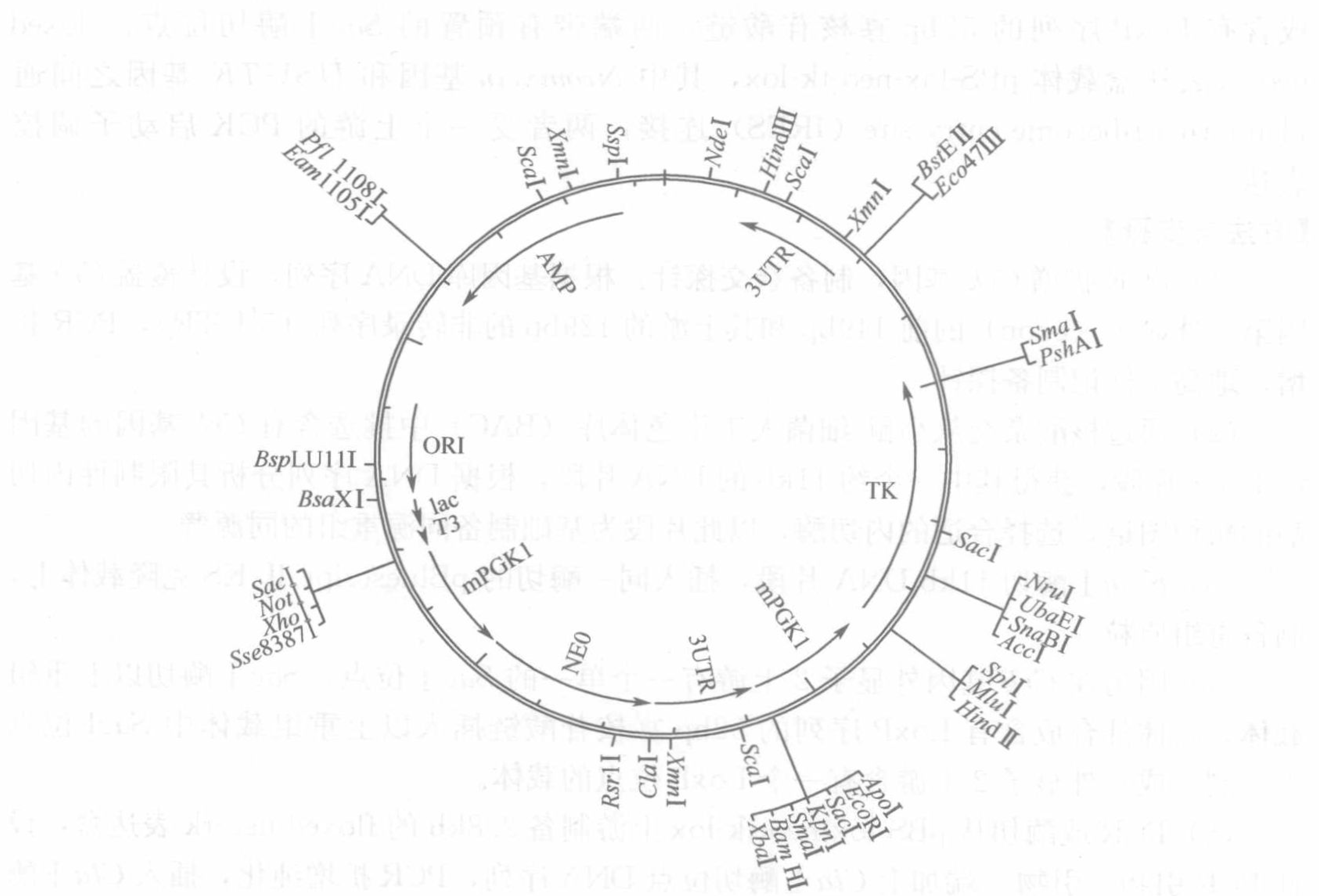


图 10-2　打靶基础载体 pPNT 的物理图谱

图中表示质粒的单一限制性酶切点，*PGK-Neo* 和 *PGK-tk* 表达盒的位置及转录方向

（卞继峰）

10.1.2　*C-Crk* 基因打靶载体的构建

【实验原理】

C-Crk 是禽病毒的 v-Crk 在细胞中的同源物，位于人染色体 17p13.3；C-Crk 本身

没有催化功能，但可造成蛋白酪氨酸磷酸化，广泛参与细胞信号途径的调控。蛋白功能域 SH2/SH3 的基因突变可造成其转化功能的丧失。常规 *Crk* 基因敲除可以造成颅神经嵴细胞（cranial neural crest）和心神经嵴（cardiac neural crest）发育缺陷，导致胚胎细胞死亡。为进一步研究 *C-Crk* 的功能，需要采用条件性基因敲除（conditional gene knockout）技术建立 *C-Crk* 基因敲除小鼠。

【实验用品】

（1）仪器与用品：PCR 仪、恒温水浴箱、台式高速离心机、恒温水浴摇床、核酸电泳装置等常规分子生物学仪器及可调式微量移液器等。

（2）试剂：基因克隆所需要的工具酶，*Kpn* Ⅰ、*Sac* Ⅰ、*Cla* Ⅰ、*Spe* Ⅰ、T4 DNA 连接酶，地高辛 DNA 探针标记试剂盒，Southern 核酸杂交试剂等。

（3）材料：基因克隆所需的工程细菌和载体：构建打靶载体的载体骨架为 pBluescript SKII；pMC-Cre 载体，为表达 Cre 重组酶的真核细胞表达质粒；体外合成含有 LoxP 序列的 52bp 寡核苷酸链，两端带有预置的 *Sac* Ⅰ 酶切位点；floxed neo-tk 表达盒载体 pBS-lox-neo-tk-lox，其中 *Neomycin* 基因和 *HSV-TK* 基因之间通过 internal ribosome entry site（IRES）连接，两者受一个上游的 PGK 启动子调控表达。

【方法与步骤】

（1）PCR 扩增 *Crk* 基因，制备杂交探针：根据基因库 DNA 序列，设计覆盖 *Crk* 基因第一外显子（exon）的前 149bp 和其上游的 129bp 的非转录序列（5′UTR），PCR 扩增，地高辛标记制备探针。

（2）通过核酸杂交从小鼠 细菌人工染色体库（BAC）中挑选含有 *Crk* 基因的基因组 DNA 片段，获得其中一个约 11kb 的 DNA 片段，根据 DNA 序列分析其限制性内切酶的酶切图谱，选择合适的内切酶，以此片段为基础制备同源重组的同源臂。

（3）*Kpn* Ⅰ 酶切 11kb DNA 片段，插入同一酶切的 pBluescript Ⅱ KS 克隆载体上，制备重组质粒。

（4）因为在 *Crk* 基因外显子 2 上游有一个单一的 *Sac* Ⅰ 位点，*Sac* Ⅰ 酶切以上重组载体，将体外合成含有 LoxP 序列的 52bp 寡核苷酸链插入以上重组载体中 *Sac*I 位点上，制备成在外显子 2 上游含有一个 LoxP 位点的载体。

（5）PCR 或酶切从 pBS-lox-neo-tk-lox 上游制备 2.8kb 的 floxed neo-tk 表达盒，设计 PCR 引物，引物 5′端加上 *Cla* Ⅰ 酶切位点 DNA 序列，PCR 扩增纯化，插入 *Cla* Ⅰ 酶切的重组载体上，得到重组载体 pBS-lox-Crk-lox-neo-tk-lox。

（6）经 *Spe*I 酶切线性化重组载体 pBS-lox-Crk-lox-neo-tk-lox，纯化即得到 Crx 打靶载体。然后用于 ES 细胞的电转和筛选，新霉素基因筛选获得同源重组的 ES 细胞。

（7）将 pMC-Cre 质粒瞬时转染 ES 细胞，Cre 重组酶基因在 ES 细胞表达，根据 Cre 酶表达强度的不同，可获得不同的 Cre-LoxP 重组类型 ES 细胞，包括 floxed-Crk、floxed-neo-tk 和基因敲除三种形式。以上三种形式细胞的鉴定需要设计结合不同部位的三种探针进行 Southern 杂交完成（图 10-3）。

（8）最后将正确的 ES 细胞显微注射到 blastocytes，PCR 基因 typing 和 Western

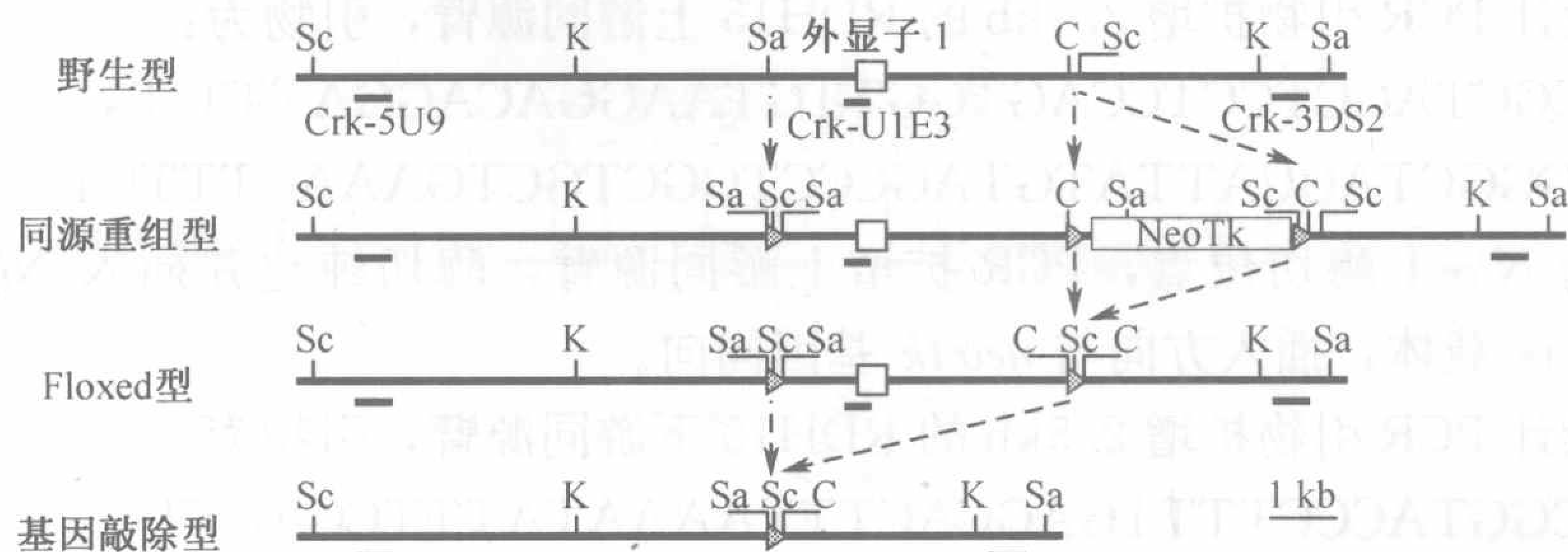


图 10-3 小鼠 *Crk* 基因的不同等位基因型

不同的短横线表示用于 Southern Blot 检测鉴定以上基因型的寡核苷酸探针；三角形代表 LoxP 位点，空心框为外显子 1 位置（Park，et al. 2006）

blot 筛选 *Cre* 基因敲除小鼠。

（卞继峰）

10.1.3 视黄醇脱氢酶 *RDH15* 基因打靶载体的构建

【实验原理】

RDH15 是一类视黄醇氧化脱氢酶，在类维生素 A 的循环中发挥关键作用，RDH15 在 RPE 和视网膜中都有很高的表达，为了进一步深入研究 RDH15 的功能，本实验设计了一种快速有效的 *RDH15* 基因打靶技术用于构建 *RDH15* 基因敲除小鼠。

【实验用品】

（1）仪器与用品：PCR 仪、恒温水浴箱、台式高速离心机、恒温水浴摇床、核酸电泳装置等常规分子生物学仪器，以及可调式微量移液器等用品。

（2）试剂：基因克隆所需要的工具酶，*Kpn* Ⅰ、*Sac* Ⅰ、*Cla* Ⅰ、*Spe* Ⅰ、T4 DNA 连接酶，地高辛 DNA 探针标记试剂盒，Southern 核酸杂交试剂等。

（3）材料：*HSV-TK* 基因表达盒，打靶载体骨架质粒 pGEM13zf（+），含有 *Neomycin* 基因表达盒的 pMC1neo 质粒（Stratagene 公司）（图 10-4、图 10-5），含有 *HSV-TK* 基因表达盒的 pPNT 质粒，129/Sv 同系的 ES 细胞。

【方法与步骤】

（1）体外设计合成含有 *Not* Ⅰ、*Nhe* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ 和 *Hind*Ⅲ的寡核苷酸片段，用来替换 pGEM13zf 质粒的多克隆酶切位点的 *Not* Ⅰ、*Sfi* Ⅰ 和 *Hind*Ⅲ，获得新的 pGEM-mcs 载体。

（2）针对 *HSV-TK* 表达盒 DNA 序列设计 PCR 引物，并在引物 5′添加 *Bam*H Ⅰ 酶切位点，PCR 扩增 pPNT 质粒中的 *HSV-TK* 表达盒，酶切插入 *Bam*H Ⅰ 切割的 pGEM-mcs，获得 pGEM-tk。

（3）用 *Xho* Ⅰ 酶切将 *neomycin* 基因表达盒从 pMC1neo 载体上游离下来并插入 *Xho* Ⅰ 酶切的 pGEM-tk，获得 pGEM-neo-tk 质粒。

（4）从 129/Sv 小鼠的 ES 细胞提取基因组 DNA，用于构建打靶载体的同源重组臂。

（5）设计 PCR 引物扩增 2.4kb 的 RDH15 上游同源臂，引物为：

5′-CCCGCTAGCTCCTCCAGTGGTTGTAAGGACAGGATTT-3′，

5′-GGGGGCTAGCATTATGTAGCCCTGGCTGCTGAAACTTTCT-3′，

引物 5′端为 *Nhe* Ⅰ 酶切位点，PCR 扩增上游同源臂，酶切纯化并插入 *Nhe* Ⅰ 酶切的 pGEM-neo-tk 载体，插入方向与 *neo-tk* 基因同向。

（6）设计 PCR 引物扩增 2.5kb 的 RDH15 下游同源臂，引物为：

5′-CCCGGTACCCTTTTGAGCACTTTAAAATATTTCCACTT-3′，

5′-GGGGGTACCCAAGCTACCTGCTTTCATTAAACGGAGAAG-3′，

引物的 5′端为 *Kpn* Ⅰ 酶切位点，PCR 扩增下游同源臂，酶切纯化并插入 *Kpn* Ⅰ 切割的打靶载体上，获得完整的打靶载体 pGEM-rdh5-neo-rdh5-tk。

（7）*Not*Ⅰ 酶切线性化打靶载体，纯化 DNA 片段，电转 ES 细胞，筛选阳性细胞（图 10-6），制备基因敲除小鼠。

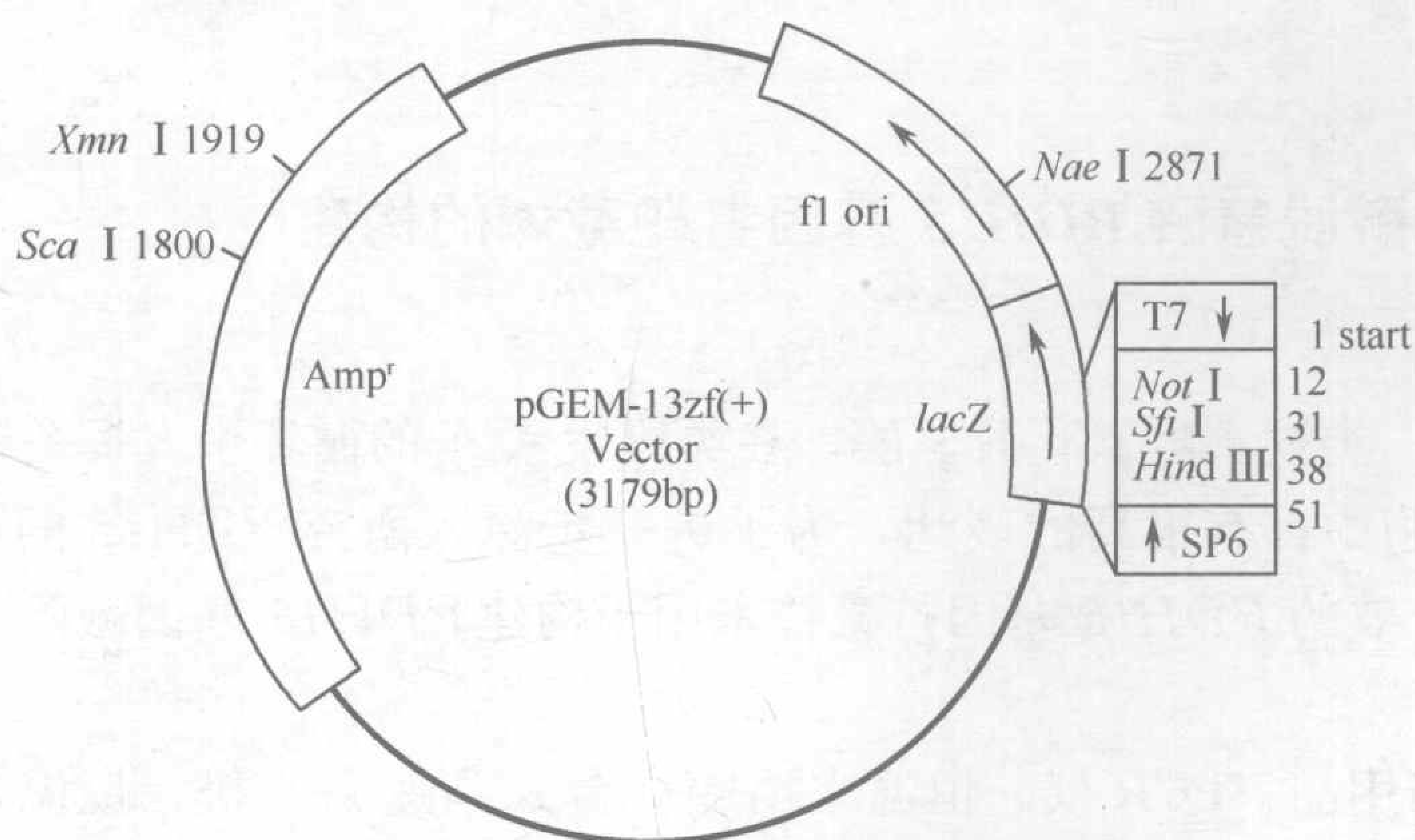


图 10-4　pGEM-13zf（+）质粒图谱

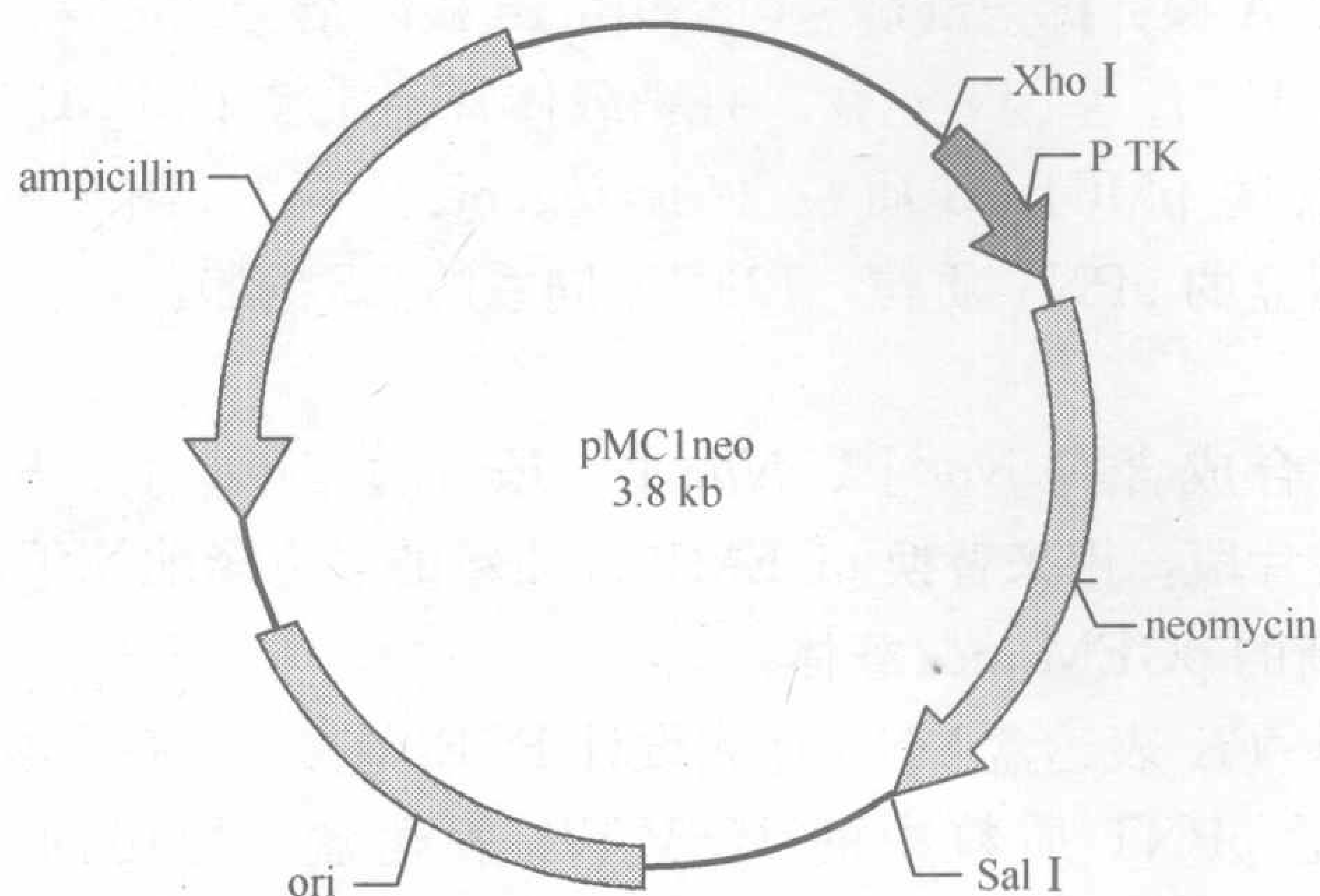


图 10-5　pMC1neo 质粒图谱

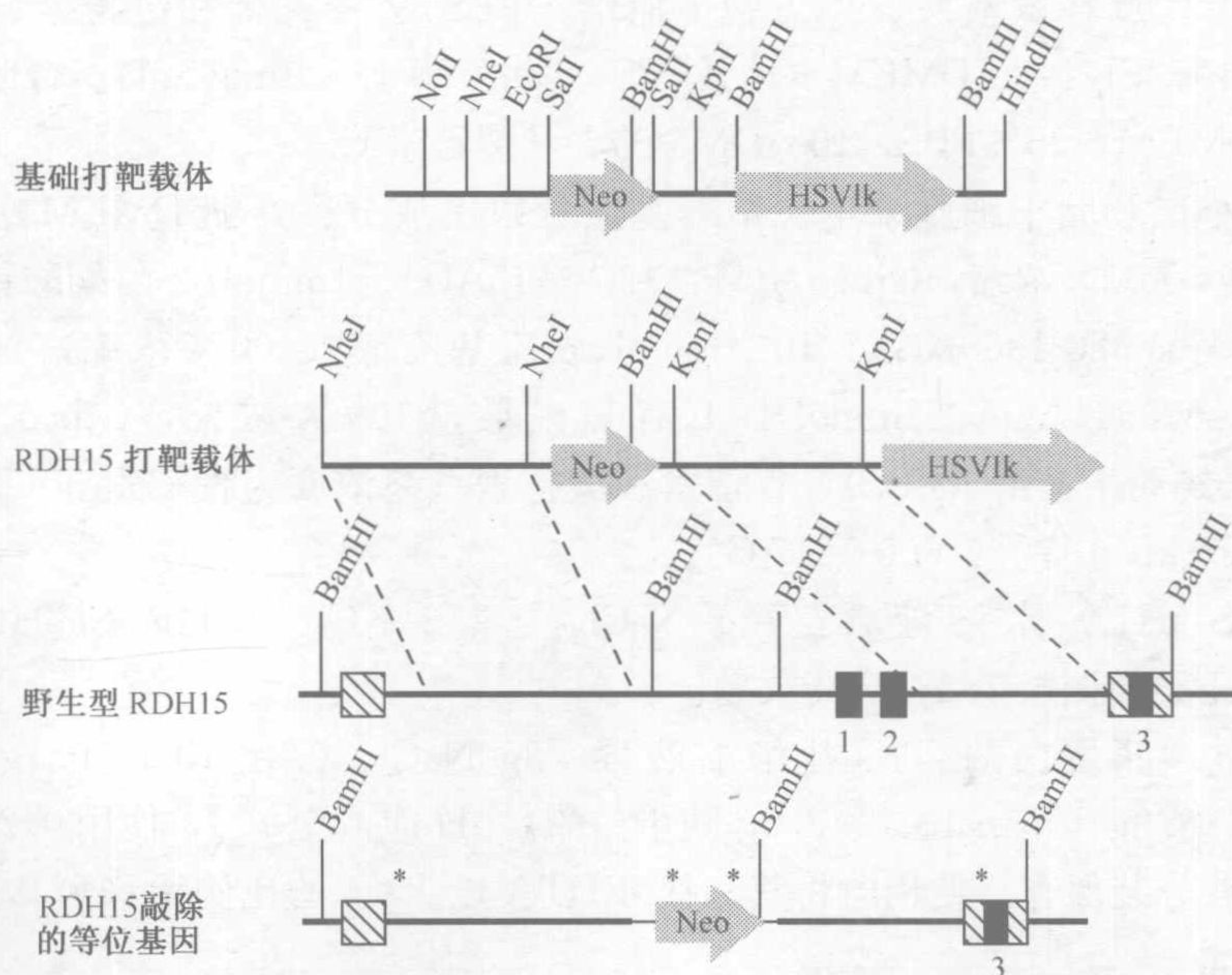


图 10-6　基础打靶载体和 *RDH15* 打靶载体图谱以及野生型 *RDH15* 和 *RDH15* 敲除的等位基因

实体框显示 *RDH15* 基因外显子 1、2；斜体框显示 Southern Blot 寡核苷酸探针位点；星号显示用于鉴定 *RDH15* 敲除的 ES 细胞的 PCR 引物位点。在 *RDH15* 敲除的 ES 细胞中，*RDH15* 基因外显子 1、2 被 *neomycin* 基因所替代（Driessen et al. 2003）。(图 10-4 和图 10-6 分别为本实验所采用的相关质粒的物理图谱，显示单一限制性酶切位点和 PGK-Neo 的位置和转录方向)

（卞继峰）

10.2　胚胎干细胞基因敲除

10.2.1　胚胎干细胞的增殖和维持

【实验原理】

胚胎干细胞具有自我更新的能力和分化为多种组织细胞的潜能。在体外培养中，胚胎干细胞保持未分化状态，需要特定的培养基和培养条件。

【实验用品】

1. 仪器与用品

层流柜、CO_2 细胞培养箱、倒置显微镜、液氮储存罐、台式离心机、水浴箱、无菌解剖器械（70%乙醇润洗）、筛网（网孔直径 1mm，高压灭菌）、50ml 玻璃珠（直径 5mm）（置于烧瓶中高压灭菌）、搅动棒（高压灭菌）、500ml 三角烧瓶（具锡箔盖或塞子）、一次性注射器（5ml 规格）针栓、150mm 组织培养皿、冻存管等。

2. 试剂及配方

高糖 DMEM、0.1mmol/L 非必需氨基酸、1mmol/L 丙酮酸钠、10^{-6}mol/L β-巯基

乙醇、2mmol/L L-谷氨酰胺、15%胎牛血清（FBS）、青霉素和链霉素、PBS溶液、0.05%胰蛋白酶/EDTA、DMEM+10%FBS、DNA酶Ⅰ（10mg/ml）、台盼蓝、1×冻存培养基（DMEM，25%FBS，10%DMSO）、丝裂霉素C。

（1）D3小鼠胚胎干细胞系生长培养基应含以下成分：高糖DMEM、0.1mmol/L非必需氨基酸（100×浓缩，Gibco货号：320-1140AG）、1mmol/L丙酮酸钠（100×浓缩，Gibco货号：320-1360AG）、10^{-6} mol/L β-巯基乙醇（100×浓缩，−20℃保存，Sigma货号：600564AG）、2mmol/L L-谷氨酰胺（100×浓缩，Gibco货号：320-5030AG）、15%胎牛血清（FBS）、青霉素和链霉素（终浓度为青霉素50U/mL和链霉素50μg/mL，Gibco货号：600-564AG）。

（2）PBS（1L）水溶液含：10g NaCl、0.25g KCl、1.44g Na_2HPO_4、0.25g KH_2PO_4，pH必须调至7.2，高压灭菌。

（3）1L 5×胰蛋白酶/Tris-盐浓缩液含：8g NaCl、0.4g KCl、0.1g Na_2HPO_4、1.0g葡萄糖、3.0g Trizmabase、2.5g胰蛋白酶。pH应调至7.6，使用0.22μm滤膜过滤除菌，10ml分装保存。使用时将其和盐/EDTA以1∶4的比例稀释为0.05%胰蛋白酶/EDTA溶液。

（4）EDTA盐溶液（1L）含：0.2g EDTA、8.0g NaCl、0.2g KCl、1.15g Na_2HPO_4、0.2g KH_2PO_4、0.01g苯酚红、0.2g葡萄糖。pH应调至7.2，使用0.22μm滤膜过滤除菌，室温保存。

3. 材料

交配14～16d后（dpc）孕小鼠、D3或R1小鼠胚胎干细胞系。

【方法与步骤】

1. 小鼠胚胎成纤维细胞的分离及培养

（1）处死孕小鼠（约15dpc）；

（2）用70%乙醇消毒腹部，取出子宫；

（3）将子宫置于含PBS的100 mm培养皿中，从子宫和所有膜组织中取出胚胎；

（4）将胚胎转移到新的培养皿中（含PBS）；

（5）去除头和所有内脏（肝、心、肾、肺和肠）；

（6）在含50ml PBS的50ml Falcon管中清洗8～10个标本，至少两次，以尽可能多的去除血等组织；

（7）使用眼科剪在2ml PBS中将标本剪碎，约2～3mm见方的小块；

（8）使用注射器针栓，在筛网上挤压10～12个标本到三角瓶内（含20ml玻璃珠和搅动棒）；

（9）用50ml胰蛋白酶/EDTA冲洗残留在筛网上的团块；

（10）如果溶液变得过于浑浊（因释放DNA），加200μl DNA酶Ⅰ（10mg/ml），37℃条件下搅拌孵育30 min；

（11）另加50ml胰蛋白酶/EDTA，再搅拌30 min；

（12）重复步骤（11）；

（13）收集细胞悬液，离心细胞（1000r/min，5 min）；

（14）用 DMEM＋10％FBS 洗细胞团（两次），以除去胰蛋白酶活性，重悬细胞团于 10ml DMEM＋10％FBS。如果细胞过于浑浊，加 200μl DNA 酶Ⅰ（10mg/ml），37℃条件下进一步孵育 30min；

（15）使用台盼蓝计数活细胞。可以从 10 个胚胎收获 $5\times10^7\sim10^8$ 个活细胞；

（16）每个 150mm 组织培养皿中可放入 5×10^6 个有核细胞，25ml DMEM＋10％FBS，37℃条件下（空气中含 5％CO_2）培养过夜；

（17）24h 后更换培养基以去除细胞碎片；

（18）培养 2～3 天后，可形成一个融合的单细胞层。用胰蛋白酶消化细胞，以1∶5传代；

（19）当细胞融合后（通常 2～3 天），冻存细胞，每个培养皿里的所有细胞冻存到一个冻存管中（1ml，1×冻存培养液），－70℃冻存一天；

（20）转入液氮中保存。

2. 小鼠胚胎成纤维细胞滋养层的制备

（1）在 37℃条件下迅速解冻小鼠成纤维细胞（1 管）。

（2）加 10ml DMEM＋10％FBS，离心（1000r/min，5min）。

（3）加 10ml DMEM＋10％FBS，轻轻地重悬细胞团，分装到 5 个 150mm 培养皿中（共含 25ml DMEM＋10％FBS）。

（4）孵育细胞（37℃，5％ CO_2）。

（5）当细胞形成一个融合的单细胞层时（3d），或者传代（1∶5），或者直接用丝裂霉素 C 进行处理。

（6）去掉培养液，加 10ml DMEM＋10％FBS（含 100μl 1mg/ml 丝裂霉素 C）。旋动培养皿，使培养液分布均匀。

（7）孵育细胞（37℃，5％CO_2，2～2.5 h）。

（8）每皿用 10ml PBS 洗两次单层细胞。

（9）每皿加 10ml 胰蛋白酶/EDTA。

（10）孵育（37℃，5％CO_2），直到细胞脱离培养皿底面（5～10min）。

（11）每皿加 10ml DMEM＋10％FBS，用吸管轻轻吹散细胞聚合体。

（12）离心（1000r/min，5min），加 DMEM＋10％FBS 重悬。

（13）计数细胞，稀释细胞浓度到 2×10^5 个/ml。

（14）迅速将细胞放入到适合作胚胎干细胞培养的培养皿中（含 DMEM＋10％FBS）。细胞接种密度请参考第 11 章表 11-1。

（15）最好过夜让滋养细胞贴壁，或者 2h 后即可使用。

（16）在加入胚胎干细胞前，把培养基换成胚胎干细胞培养基。

3. 胚胎干细胞在滋养层上生长

（1）迅速解冻 1 管冷冻的胚胎干细胞，转移细胞至 12ml 离心管中；

（2）加 10ml 胚胎干细胞培养基，离心（1000r/min，5 min）；

（3）加 5ml 胚胎干细胞培养基，重悬，种到 60mm 小鼠胚胎成纤维细胞铺盖的培养皿中；

（4）第二天更换培养基；

（5）在第二天用 PBS 洗细胞，然后加 2ml 胰蛋白酶/EDTA；

（6）孵育 3～5min 或等到细胞脱离培养皿（37℃，5%CO_2）；

（7）轻轻的上下吹吸细胞以打碎细胞团；

（8）加 5ml 胚胎干细胞培养基，离心（1000r/min，5min）；

（9）吸去上清液，重悬于 5～7ml 培养基中；

（10）将 1ml 细胞悬液（约 2×10^6 个 D3 细胞或 1×10^6 个 R1 细胞/60 mm 培养皿）传递到一个含 4ml 胚胎干细胞培养基的 60mm 新饲养层上。

（11）第二天更换培养基（若有很多死细胞），如上所述每第二天传细胞。

【观察与结果】

胚胎干细胞在滋养层细胞上呈圆形生长，能形成集落，保持未分化状态。

【注意事项】

（1）小鼠胚胎成纤维细胞主要的缺点是其生命持续时间短（15～20 次群体倍增），而能做饲养层的细胞最好是第 3～6 代，因此，需要定期制备及冻存细胞。

（2）冻存胚胎干细胞最好使用 $5\sim10\times10^6$ 个/ml 冻存培养液的细胞密度。

（3）血清的质量对于维持胚胎干细胞非常重要。推荐去检验不同供应商不同批次的胎牛血清 FBS 对多能胚胎干细胞的生长支持作用。合适批号的血清应该大量订购，于 −20℃保存。

（4）详细的胚胎干细胞培养方法可参考第 11 章 11.1.1 小鼠胚胎干细胞分离，培养和诱导分化。

（王晓静　顾卫红　周永兴）

10.2.2　胚胎干细胞标准电穿孔

【实验原理】

几种不同的方法可用于将 DNA 载入胚胎干细胞，较普遍且成功使用的方法是电穿孔转染 DNA。这个方法的好处是技术相对简单一些，其主要的缺点是低转化细胞率（$10^{-3}\sim10^{-4}$），在标的载体中需要使用选择标记基因。通过对细胞和 DNA 的悬浮液应用高压电脉冲将 DNA 转染进入胚胎干细胞。

【实验用品】

（1）仪器与用品：电穿孔仪器、电穿孔杯。

（2）试剂：胚胎干细胞培养基（见 12.2.1）、500 或 1000 U/ml LIF（Gibco）、PBS（无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}）、100mm 涂胶的培养皿、G418、更昔洛韦（Ganciclovir GNAC）。

（3）材料：D3 小鼠胚胎干细胞系。

【方法与步骤】

（1）复苏胚胎干细胞，于传代后的第二天（36h）进行转染实验。

（2）100 mm 培养皿加入 3ml 胰蛋白酶，轻轻吹打成单细胞悬液，加 7ml 培养基终止消化，继续轻轻吹打。

（3）对 D3 或 R1 细胞，在电转染细胞前，需先在培养皿中孵育 30min 或 15min（37℃，5%CO_2）去除贴壁的饲养层细胞。

（4）小心收集胚胎干细胞，1000r/min 离心 5min。

（5）弃上清，重悬细胞于冷 PBS。

（6）计数胚胎干细胞，调节细胞浓度至 7×10^6 个/ml。

（7）混合 0.8ml 细胞悬液和 40μg 线性化载体 DNA（大约 10kb 载体），转移到电穿孔杯中。

（8）事先设置好电穿孔条件（240V，500μF 基因脉冲源）。

（9）将电穿孔杯放到支架上，电极朝向输出导线。

（10）发送电脉冲。

（11）从支架上移走电穿孔杯，放置于冰上 20min。

（12）将电穿孔杯中的细胞悬液与 10ml 或 20ml 含 LIF 的胚胎干细胞培养液混匀，分别接种到预铺饲养层的 100mm 培养皿中（10ml/100mm 培养皿）。

（13）24h 后，加 150～250μg/ml 活性 G418，2μmol/L 更昔洛韦进行筛选。之后需每天更换新鲜的筛选培养基。

【观察与结果】

大约选择 8 天后，药物抗性克隆应该出现。

【注意事项】

（1）应用脉冲后，DNA 通过膜孔进入细胞。在转染效率最优条件下，约 50%的细胞会死亡。

（2）影响转染效率和细胞活性的参量是电压，离子浓度，DNA 浓度和细胞浓度。理论上，应测试这些所有参量以提高细胞活性转染效率。

（王晓静　顾卫红　周永兴）

10.2.3　鉴定、筛选重组的胚胎干细胞

【实验原理】

鉴别已经成功同源重组的胚胎干细胞非常重要。聚合酶链式反应的发展与应用便于快速鉴定同源重组事件。随着筛选方案和胚胎干细胞培养技术及 DNA 分离方法的改进，用 Southern 印迹分析来筛选大量的胚胎干细胞克隆更加容易。

【实验用品】

（1）仪器与用品：巴斯德移液管、解剖显微镜、反应管（500ml）。

（2）试剂：PBS（无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}）、无机油、蛋白激酶 K（10mg/ml，冷冻分装）、dNTP 冷冻浓缩液（分别含 10mmol/L dATP、dCTP、dGTP、dTTP）、10×PCR 缓冲液（100mmol/L Tris-HCl pH8.3，500mmol/L KCl，15mmol/L $MgCl_2$），0.1% 凝胶）、*Taq* 合成酶。

（3）材料：D3 小鼠胚胎干细胞。

【方法与步骤】

(1) 约 8 天的药物选择后，弃培养基，用 PBS 清洗一遍，再换上 10ml PBS。

(2) 巴斯德移液管在显微镜下挑选抗性胚胎干细胞集落（只挑选集落的一半）。

(3) 收集 20～50 个克隆于一个反应管中。

(4) 微量离心机中离心 15s，弃去 PBS，留 5 μl。

(5) 加 35μl dd H_2O，涡旋震荡细胞团。

(6) 干冰上放置 5min。

(7) 95℃加热，10min。

(8) 加 50μl 无机油。

(9) 冷却反应管至 50℃。

(10) 加 1μl 蛋白激酶 K（10mg/ml）。

(11) 50℃孵育 90min。

(12) 热灭活蛋白激酶 K，94℃，5min。

(13) 在 4℃条件下加入到蛋白溶液中，加入 PCR 反应液。

(14) 如下条件运行 PCR 反应 40 个循环：

· 变性条件：94℃ / 30s～1min

· 复性：50～62℃/2min

· 延伸：60～72℃/2～7min

(15) 取 10μl 样品，进行琼脂糖凝胶电泳分析。

(16) 膜上印迹 DNA。

(17) 用含有插入序列的目的探针杂交印迹。

(18) 洗膜，曝光 5min～1h（15 到 30min 曝光后可见对照 DNA 带和同源重组带）。

(19) 选择 Southern 印迹为阳性的克隆，对每个单克隆（取一半）重复 PCR 反应（同上）。每个克隆的另一半接种到铺有饲养层细胞的 24 孔板。

(20) PCR 再次证实为阳性的单克隆，可接种到 24 孔板传代一次或两次（按照细胞密度决定），然后进行 Southern 印迹分析。

(21) 细胞一旦长满，即可用于胚泡注射。尽可能的冻存一部分细胞，保存于液氮中。

【观察与结果】

运用 PCR 及 Southern 印迹分析筛选出阳性克隆。

（王晓静　顾卫红　周永兴）

10.3 嵌合体小鼠的制备

在发育的最初阶段，哺乳动物胚胎细胞具有高度的恢复能力，它们既能够耐受组织损伤，又能够从功能上与来自其他胚胎的细胞相融合。哺乳动物胚胎的这种在发育期间能够与外来胚胎细胞相融合的能力，已经被成功地用于多种研究：包括阐明细胞谱系，研究细胞潜能，以及通过对胚胎干细胞进行基因打靶后引入个体进而选择基因改变的新

型个体。外来的胚胎细胞能否参与到宿主胚胎细胞中并得以生存，将取决于它们的生活状态、基因类型、有丝分裂和发育潜能以及与宿主胚胎细胞发育的同步性。如果要将变化的基因型传递给下一代，外来的胚胎细胞也必须有机会参与生殖细胞的形成并能进行减数分裂和配子发生。

胚胎干细胞系的建立为此提供了良好的细胞来源。即使经过长时间培养，胚胎干细胞仍然可以保持多分化潜能，参与嵌合体所有组织的形成，包括配子。在过去五年中，胚胎干细胞研究有了快速发展，通过体外基因打靶，建立突变，进而通过嵌合体种系传递突变基因的方法得到了广泛的应用。

10.3.1　嵌合体小鼠的产生

【实验原理】

嵌合体小鼠的产生需要4种小鼠，即结扎雄小鼠、假孕雌鼠、种雄鼠和提供胚胎的雌鼠。让种雄鼠与提供胚胎的雌鼠交配产生胚泡，体外分离胚泡，再把重组的胚胎干细胞通过显微注射注入到胚泡中，最后把显微注射后的胚泡移植到假孕雌鼠的子宫里，产生第一代嵌合体小鼠。

【实验用品】

1. 仪器与用品

手术器械、棉花、巴斯德吸管、显微操纵仪、倒置显微镜、培养皿、口吸管。

2. 试剂及配方

70%乙醇、含10%胎牛血清的PB-1培养液、轻液体石蜡油、肾上腺素。10%胎牛血清的PB-1培养液的配制：

（1）按以下配方制备原液：

	原液（g/100ml）	体积（ml）
NaCl	0.9	68.96
KCl	1.148	1.84
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	5.5101	5.44
KH_2PO_4	2.096	0.96
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.1617	0.88
$MgCl_2$	3.131	0.32
丙酮酸钠	0.020（在NaCl原液中）	22.40

（2）添加下列物质，制备10^4ml的培养基：

青霉素	6.2mg
葡萄糖	104mg
蒸馏水	2.16ml
酚红（1%）	0.1ml

（3）加入10%的胎牛血清（56℃，30min灭活）。

（4）过滤灭菌，分装后冷藏备用。

3. 材料

供胚雌鼠、雄鼠、结扎雄鼠、假孕雌鼠。

【方法与步骤】

1. 胚泡的收获

(1) 将雌鼠和有生育能力的雄性种鼠放在一起。

(2) 在第二天中午之前检查阴道栓（这是妊娠的第一天）。

(3) 在妊娠第四天（交配后三天半），通过颈椎脱臼法处死孕鼠。

(4) 用 70％乙醇擦拭腹部，并在中腹部，做一个小的横切口。用浸有酒精的棉花擦去剪断的毛发。

(5) 在切口前后，抓住皮肤，撕开皮肤，并分别将皮肤拉到前肢和后肢处。撕开的方法避免了切口内有断毛发的问题。

(6) 使用大的横切口打开腹膜，暴露腹腔。

(7) 通过向头侧推动肠道，在尾侧，定位生殖道。用钝头镊子，抓住接近膀胱基底部的子宫分叉点。

(8) 提起子宫，切开宫颈，继续提起，在两侧，夹开子宫系膜和支持子宫的肠系膜。

(9) 在输卵管和卵巢之间，做一个通过黏液囊的切口，或者通过两侧各自的子宫-输卵管接合部，分离整个输卵管。

(10) 使用低功率切割显微镜，修整输卵管。

①在干燥无菌的培养皿内，铺开输卵管，并剪去残留的肠系膜和脂肪。

②在子宫-输卵管接合部，切断输卵管，在各子宫角的末端，做一个 0.5cm 长的纵向夹闭。

③切开宫颈，暴露两个子宫角的入口。

(11) 用几滴培养液冲洗，并将输卵管放到无菌的培养皿上。使用已经拔出并断开的巴斯德吸管上的橡胶吸球，通过插入吸管尖端到宫颈末端内，经过各子宫角，用大约 0.5ml 培养液冲洗。子宫将略微膨胀，培养液应当能够自由地流过输卵管。胚胎将很快地沉到培养皿的底部。

2. 胚胎内注射胚胎干细胞

(1) 用（细胞）注射吸管吸起 12～15 个圆形小胚胎干细胞，细胞在吸管尖端要排列成紧密的柱状（没有很大的空间间隔）。

(2) 用固定吸管吸起胚泡，并把它放置在一个吸管尖端对面一侧能见到内细胞团的位置。

(3) 把注射吸管放置视野中心，把胚泡置于焦点，但略偏北或南，移动注射吸管，使得它与胚泡内细胞团的位置处于同一水平，此时操纵杆操纵器处于最大的移动范围之内。

(4) 用操纵杆推移注射吸管，重新把胚泡定位于视野中心，查看胚泡的赤道面与注射吸管处于同一焦平面。此时借助操纵杆的力量，把注射吸管穿入滋养外胚层的壁。操纵杆预定的运动限度将会防止 ICM 的损坏。

(5) 将胚胎干细胞注入囊胚腔内，移出注射吸管。

(6) 把已注射的胚胎放置在操作室的一侧，重复上述步骤（对另一些胚胎进行处理）。

(7) 当使用胚胎干细胞注射了室内的所有胚胎时，在转移到假孕宿主之前，可以将它们转移到培养液中，进行短期培养。

3. 胚胎移植到输卵管

(1) 称重并麻醉假孕雌鼠。

(2) 准备好的胚胎移植管：如图 10-7 所示，拉制的窄管的尖端应当长 2～3cm，先吸入轻液体石蜡油，然后吸入一组空气后再吸入一段培养基，随后吸入一段空气作为标记气泡，再吸入含有胚泡的培养基（这里显示 6 个胚泡），最后是吸入尖端的一个小气泡。在准备小鼠时，将此放在旁边。

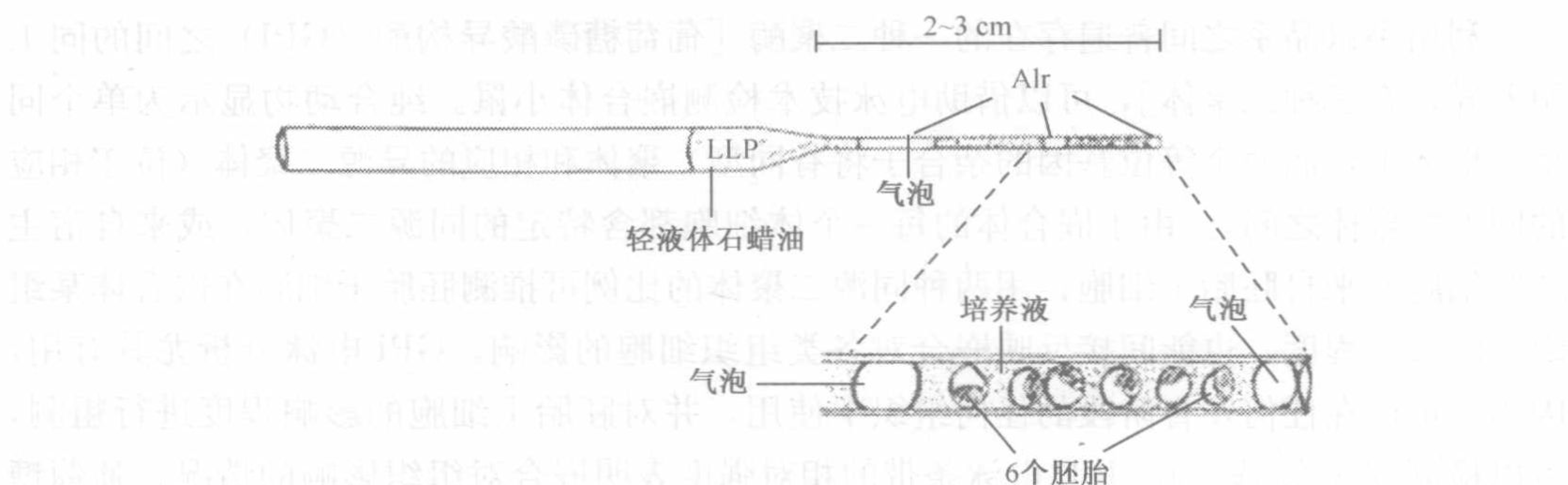


图 10-7　准备好用于胚胎移植的胚胎移植吸管的示意图

(3) 用酒精清洁小鼠背侧，并在第一腰椎水平位置的皮肤内做一个横切口。用浸有酒精的棉花擦去剪断的毛发。

(4) 向侧面扩大皮肤切口，直到透过腹膜壁可以见到左侧的卵巢脂肪垫和卵巢。通过腹膜，做一个 3mm 切口，然后用钝头镊，抓住脂肪垫，拉动它和卵巢以及输卵管通过中线方向上的切口。

(5) 将小鼠放在解剖显微镜台上，头位于 11 点位置，朝向远离你的方向。

(6) 通过用一个小的夹子夹住，或者在一侧有凹口的索引卡上，对脂肪垫铺巾，并拉动卵巢、输卵管和一小段子宫穿过凹口，在腹膜外，稳定卵巢。

(7) 利用手中的细镊子和移植吸管，查看卵巢和输卵管之间的间距，定位输卵管伞。使用镊子在黏液囊和包围着卵巢的血管透明膜内撕开一个孔。该过程可能需要从组织上去除液体或者血液，以便见到输卵管口，或者可以用一滴肾上腺素止血。

(8) 将吸管尖端插入输卵管口，并用任何一侧的气泡吹入胚胎。对于右侧或者左侧输卵管移植，输卵管开口的方向使得小鼠在大约 11 点的位置远离您，脂肪垫被拉向中线，吸管可以从右侧插入，与脊椎平行。

(9) 在输卵管的第一圈，可以见到标记气泡，但是还应当检查移植吸管，以便确保所有的胚胎被排出。

(10) 小心地将输卵管放到腹膜内。

（11）对于双侧移植，在右侧重复步骤（4）～（10）。

（12）如果腹膜切口很小，可以将腹膜切口保持在开放状态。使用小的创缘夹，关闭皮肤切口。

【观察与结果】

移植的胚泡在假孕雌鼠的子宫里正常生长，产下首代嵌合体小鼠。

【注意事项】

阴道栓通常持续到交配之后 12h，甚至存在超过 24h。由于这是变化的，最好在交配之后的上午检查阴道栓。

10.3.2　GPI 同工酶的水平淀粉凝胶电泳检测嵌合体小鼠

【实验原理】

利用小鼠品系之间普遍存在的一种二聚酶［葡萄糖磷酸异构酶（GPI）之间的同工酶差异，有三种二聚体］，可以借助电泳技术检测嵌合体小鼠。纯合动物显示为单个同型二聚体带，而两个等位基因的杂合子将有同型二聚体和相应的异源二聚体（位于相应的同型二聚体之间）。由于嵌合体的每一个体细胞都含特定的同源二聚体，或来自宿主胚胎细胞或来自胚胎干细胞；用两种同源二聚体的比例可推测胚胎干细胞在嵌合体某组织中的参与程度，也能间接反映嵌合对各类组织细胞的影响。GPI 电泳分析尤其有用，因为它可以在任何发育阶段的任何组织中使用，并对胚胎干细胞的影响程度进行粗测，可以检测到 5%的影响，并且电泳条带的相对强度表明嵌合对组织影响的情况。葡萄糖磷酸异构酶非常稳定，即使已经死亡几个小时的动物的组织也可以被成功地分型，并且样本可以被无限期地冷冻保存。一个缺点是分析使用组织匀浆，无法提供有关胚胎干细胞类型的信息。

【实验用品】

1. 仪器与用品

凝胶模、乙酸纤维素膜。

2. 试剂及配方

Electrostarch、Tris、枸橼酸、HCl、果糖-6-磷酸、NADP、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、MTT［3-(4，5-二甲基噻唑-2-)-2，5-二苯基四氮唑溴盐］、吩嗪硫酸甲酯、琼脂。

（1）凝胶成分混合：12～14g Electrostarch、95ml ddH_2O、5ml Tris-枸橼酸缓冲液，加热并搅拌，直到混合物发黏后开始鼓泡。蒸煮 60s 或者更长时间，然后在高度真空下放置 45s。随后倒入三个凝胶模内，制备 8cm×10cm×5mm 凝胶，并冷藏 12～48h。

（2）Tris/枸橼酸缓冲液（pH 6.5）：27g Tris/L、16g 枸橼酸/L。

（3）染色液：5ml 0.3mol/L Tris-HCl 缓冲液（36.3g Tris/L，用 HCl 调节 pH 到 8），1ml 果糖-6-磷酸（20mg/ml），0.1ml NADP（10mg/ml），5μl 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，0.1ml MTT（10mg/ml），0.1ml 吩嗪硫酸甲酯（10mg/ml），添加这一混合物到

6ml 熔化的 2%琼脂内。

3. 材料

小鼠血样。

【方法与步骤】

（1）添加一滴蒸馏水到一个小片段，并冻融几次，以溶解细胞，准备组织（仅需冷冻和融化血样，无需稀释）。

（2）制备 8cm×10cm×5mm 凝胶，并冷藏 12～48h。

（3）从模内取出凝胶，然后将凝胶放在玻璃皿上。使用凝胶梳，在一个边缘附近，跨过凝胶长侧，切割一排 5mm 狭槽。并且可以在凝胶中间附近，切割第二排。

（4）加载样本到凝胶上，如同下述。

①必要时短暂离心样本，以便沉淀组织片段。

②切割与凝胶狭槽适合的 2mm×5mm 乙酸纤维素条。

③用镊子将乙酸纤维素膜浸泡在各样本中，吸干过多的样本液，然后插入到凝胶狭槽内。在不同样本之间操作时，应当清洗镊子。

（5）在一个水平电泳室内，运行凝胶（阳极到阴极）（使用滤纸芯，在 120～150V，2～3h，使用 Tris/枸橼酸缓冲液，pH 6.5）。

（6）在运行结束后，立即准备染色液。

（7）当溶液略微冷却时，均匀地将溶液倒在凝胶上，37℃，暗室中孵育，直到显色。

【观察与结果】

在此条件下，GPI-1AA 跑的最为缓慢，GPI-1CC 跑的最快，GPI-1BB 处于中间。

（王晓静　顾卫红　周永兴）

10.4　基因敲除小鼠的建立

在嵌合体产生及随后的整个突变表型研究期间，对突变的便利分析及高效的繁育是关键。除了产生靶胚胎干细胞克隆所需的时间之外，靶细胞注射到胚胎内至繁育具有纯合突变等位基因的小鼠出生之间间隔的最短时间为五个月。繁育程序的任何缺陷都将大幅度增加这一过程所需要的时间。因此，必须保持高标准的动物管理和嵌合小鼠繁育程序，必须对它们的后代进行严格地监测。

10.4.1　提取鼠尾 DNA 用 PCR 来检测敲除基因

【实验原理】

提取小鼠尾巴 DNA，设计正确引物，运用 PCR 检测 DNA 条带的大小来区分野生型，杂合型及基因敲除纯合型小鼠。

【实验用品】

（1）仪器与用品：手术器械、PCR 仪、电泳仪、PCR 成像系统、台式离心机、摇

床、手掌型离心机。

(2) 试剂及配方：蛋白酶 K、Tris、EDTA、NaCl、SDS、平衡酚、氯仿、异丙醇、无水乙醇、70%乙醇、10× PCR Buffer、dNTP（2.5mmol/L）、引物、Taq DNA 聚合酶、低熔点琼脂糖、溴化乙锭、电泳缓冲液。

鼠尾裂解液：100mmol/L Tris-HCl pH 8.0、10mmol/L EDTA、10mmol/L NaCl、2% SDS。

(3) 材料：小鼠尾巴。

【方法与步骤】

1. 鼠尾 DNA 提取

(1) 剪取 1cm 左右鼠尾，放进一只 1.5ml Eppendorf 管中。

(2) 每管加入 600μl 鼠尾裂解液（10mmol/L Tris pH 8.0，10mmol/L EDTA，10mmol/L NaCl，2% SDS）。

(3) 每管加入 35μl 蛋白酶 K（10mg/ml），37℃消化，过夜或直至消化完全。

(4) 每管加入 500μl 平衡酚，最大速度室温离心 4～5min。

(5) 吸取水相，转移到一只新的 1.5ml Eppendorf 管，每管加入 500μl 酚：氯仿（1∶1），充分混合，最大速度室温离心 3～5min。

(6) 吸取水相，转移到一只新的 1.5ml Eppendorf 管，每管加入 500μl 氯仿：异丙醇（24∶1），充分混合，最大速度室温离心 3～5min。

(7) 吸取水相，转移到一只新的 1.5ml Eppendorf 管，每管加入 2 倍体积的无水乙醇，充分混合，可以看到有白色沉淀生成，即为基因组 DNA。

(8) 12 000r/min，离心 10min，沉淀 DNA。

(9) 加入 1ml 冷 70%乙醇洗涤 DNA。

(10) 尽量去除残留酒精，室温晾干 2～3min，溶于 100μl TE，37℃溶解 1～2h（或室温溶解数小时或过夜，或 60℃溶解 15～20min）。

(11) 用 2μl DNA 溶液测定 DNA 浓度。

(12) 取 1μg DNA 用于 PCR 检测。

2. PCR

PCR 扩增（30μl 体系）：

10× PCR Buffer（含 $MgCl_2$）	3μl
dNTP（2.5mmol/L）	2.4μl
PCR 引物 1（10μmol/L）	0.8μl
PCR 引物 2（10μmol/L）	0.8μl
Taq DNA 聚合酶	0.5μl
cDNA（模板）	2μl
灭菌水	20.5μl

混匀后进行 PCR 反应，反应条件如下：94℃，5min 后开始扩增循环，循环参数为 94℃ 50s，58℃ 50s，72℃ 1min，35 个循环，最后延伸 10min。

3. 琼脂糖凝胶电泳

取 PCR 扩增产物各 5μl 在 1%琼脂糖/EtBr 凝胶（EtBr 的终浓度为 0.5μg/ml）上电泳，电泳缓冲液为 1×TAE。

【观察与结果】

根据DNA条带的大小来区分基因野生型、杂合型及突变型。

【注意事项】

（1）小鼠尾巴不要剪的太长。

（2）PCR的复性温度随不同的引物大小变化。

（3）根据 DNA 条带的大小来决定电泳的时间。

（4）做 PCR 时要避免污染，*Taq*DNA 聚合酶要最后加。

（王晓静　顾卫红　周永兴）

参 考 文 献

Alexandra L. Joyner. 2000. Gene Targeting: a practical approach. Oxford University Press

Brigid Hogan, András Nagy. 2003. Manipulating the mouse embryo: a Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Deng C X et al. 1995. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. Cell, 82: 675～684

Driessen C et al. 2003. Novel targeting strategy for generating mouse models with defects in the retinoid cycle. Vision Res, 43(28): 3075～3079

Martin J. Tymms, Ismail Kola. 2001. Gene Knockout Protocols. Humana Press

Nagy A, Gocza E, Diaz E M et al. 1990. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. Development. 110: 815～821

Park T J, Boyd K, Curran T. 2006. Cardiovascular and Craniofacial defects in Crk-null mice. Mol Cell Biol, 26(16): 6272～6282

Tybulewicz V L et al. 1991. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. Cell, 65: 1153～1163

Xu B J et al. 2000. The role of brain-derived neurotrophic factor Receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB. J Neurosci, 20(18): 6888～6897

第 11 章　干细胞和组织工程技术

干细胞是一群具有自我更新和多向分化潜能的细胞。根据分化潜能的不同，干细胞可以分为全能性（totipotent）、原始多能性（pluripotent）和多能性（multipotent）干细胞，以及祖细胞（progenitors）。具有巨大分化潜力的胚胎干细胞虽然还没有在临床上得以应用，但它们的建系和定向诱导分化已成为当今研究的热点。在成体干细胞研究方面也发展迅速，如造血干细胞、神经干细胞和间充质干细胞的研究已开始进入修复医学的临床试验阶段。

以干细胞为种子细胞的组织工程学在体外构建可以用于移植再生的组织和器官。组织工程化的皮肤、软骨、骨、神经、心肌瓣膜以及泌尿系统组织都取得了进展。本章将介绍在这一领域里的一些有使用价值的技术和实验。

11.1　胚胎干细胞培养技术与方法

胚胎干细胞（embryonic stem cell，ES cell）来源于早期胚胎的胚泡（blastocyst）中分离出的内细胞团，是在体外培养获得的一种原始多能（pluripotent）干细胞，具有体外无限增殖和多向分化潜能两个显著的基本特点。自从 1981 年，使用成纤维细胞饲养层和含血清的培养液第一次成功地从小鼠胚胎中分离和培养出胚胎干细胞以来，小鼠胚胎干细胞的常规建系和培养技术日趋成熟。迅速扩增的健康小鼠胚胎干细胞可以保持稳定的遗传性能，使其在研究正常胚胎发育和基因功能中有特殊的价值。小鼠胚胎干细胞可以在体外基因打靶建立突变和形成嵌合体（chimeras），并保持其扩增传代和发育多能性，引入的改造基因可以通过种系传递（germline transmission）遗传下去。

自从 1998 年，Thomson 等报道了第一批成功的人胚胎干细胞系以来，已经有 200 多种人胚胎干细胞系被公开发表。这些胚胎干细胞系不仅能分化成人体中的任何一类细胞，而且在合适的条件下，能无限制地繁殖，表达高水平端粒酶的活性，典型的标志物，并维持正常的染色体核型。正因为具有这些特性，人胚胎干细胞系在研究人类发育生物学和临床细胞疗法中有巨大的潜力。虽然人的胚胎干细胞系还不能形成嵌合体和种系传递，但它们被证明可以定向分化成神经细胞、造血细胞、间充质细胞、软骨细胞、肝脏细胞、心肌细胞等，因而在细胞和组织替代疗法中有巨大的潜力。

11.1.1　小鼠胚胎干细胞的分离，培养及诱导分化

【实验原理】

培养和建立胚胎干细胞系的主要步骤是：①小鼠体内或体外受精，获得早期胚胎，用免疫外科法（immunosurgical isolation）或机械分离法从胚胎中分离内细胞团；②将内细胞团转移到小鼠胚胎成纤维细胞（mouse embryo fibroblast，MEF）饲养层上培养和传代，建立胚胎干细胞系；③用细胞生物学和分子生物学方法进行鉴定。

小鼠胚胎干细胞在体外培养时对环境因素十分敏感，容易分化，为了使胚胎干细胞保持未分化状态，必须培养在失去有丝分裂能力的饲养层上，或者加入白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor，LIF)，同时避免其他因素的影响，如酸碱度变化、温度变化以及细胞生长过于密集等。如果处理不当，即使在培养于成纤维细胞饲养层上和 LIF 存在的条件下，干细胞也会自动分化。

鉴于小鼠胚胎干细胞系易于分化，在体外建系及长期培养过程中，必须按照国际标准严格鉴定。典型的小鼠胚胎干细胞系必须具备以下特性：①维持在未分化状态；②有正常的染色体核型；③有正常的分化潜能。

体外研究胚胎干细胞分化的方法主要是通过悬浮培养法形成类胚体（embryoid body，EB)。EB 途径是在小鼠胚胎干细胞分化研究中常用的一种分化途径，包括自发分化和诱发分化两种方式。研究证明，小鼠胚胎干细胞分化形成的 EB 结构可以表达小鼠三个胚层的细胞，因此 EB 的形成被认为是模拟了体内胚胎发育分化环境。另一种途径是直接诱导途径，即让 ES 细胞在贴壁的培养环境中，通过向培养液中添加生长因子或其他种类的化学物质，或者将 ES 细胞与其他种类的细胞共培养，使 ES 细胞向某种特定类型的细胞分化。

本实验将重点介绍经典的小鼠胚胎干细胞分离、培养、鉴定及体外诱导分化的方法。

【实验用品】

1. 实验器材

CO_2 培养箱、高速离心机、解剖显微镜、倒置显微镜和荧光显微镜、培养瓶、细菌培养皿、0.22μm 无菌微孔滤膜、离心管、移液管、冻存管、10ml 注射器和无菌解剖器械等。

2. 试剂与配方

1）小鼠胚胎成纤维细胞培养液（MEF 培养液）

90%	DMEM
10%	胎牛血清（fetal bovine serum，FBS)
100U/ml	青霉素/链霉素

2）胚胎干细胞培养液

79%	DMEM
20%	胎牛血清
0.2mmol/L	谷氨酰胺
1%	非必需氨基酸
0.1mmol/L	β-巯基乙醇
100U/ml	青霉素/链霉素
1000U/ml	白血病抑制因子 LIF

3）EB 培养液

90%	DMEM

10%　胎牛血清

0.2mmol/L　谷氨酰胺

1%　非必需氨基酸

0.1mmol/L　β-巯基乙醇

100U/ml　青霉素/链霉素

4）胰蛋白酶-EDTA 消化液

0.25% 和 0.05% 胰蛋白酶-EDTA 溶液，用以消化分散胚胎干细胞。

5×胰蛋白酶浓缩液成分：

NaCl	8g
KCl	0.4g
Na_2HPO_4	0.1g
葡萄糖	1.0g
Trizmabase	3.0g
胰蛋白酶	2.5g

使用时，与 EDTA 以 1：4 比例稀释为 0.05%胰蛋白酶-EDTA 溶液，pH 调至 7.2，然后使用 0.22μm 滤膜除菌，−20℃分装保存。

5）其他实验试剂

0.1% 明胶（gelatin）：明胶粉 0.5g 溶于 50ml 生理盐水中，高压灭菌 30min。

PBS（Ca^{2+}，Mg^{2+}-free）用以清洗胚胎和胚胎干细胞集落（colony）。

二甲基亚砜（DMSO）。

3. 实验材料

（1）提供胚泡阶段胚胎的孕小鼠：如 DBAI/cacJ，129/SVJ，或 C57BL/6 小鼠（Jackson Lab）。

（2）提供胚胎成纤维细胞的小鼠：如怀孕 13～14 天昆明白小鼠或 CF-1 小鼠。

【方法与步骤】

1. 小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）饲养层的制备

1）原代 MEF 细胞的分离和培养

（1）孕 13～14 天昆明白小鼠，颈椎脱臼处死。用 70%乙醇消毒腹部，打开腹腔暴露子宫。取出胚胎，弃除头部、内脏及四肢，用含青霉素/链霉素的无菌生理盐水冲洗保留的胚胎部分。

（2）用眼科剪剪碎胚胎至 $1mm^3$ 大小的组织块，加入 0.25%胰蛋白酶-EDTA 溶液，置 37℃消化 20～30min。

（3）加入小鼠胚胎成纤维细胞培养液终止消化，用吸管温和地上下吹打成单细胞悬液，在转速 1000 r/min 下，离心 5min。

（4）弃上清，用新鲜的 MEF 培养液重新悬浮细胞，将细胞悬液（接种密度见表 11-1）分装接种在预先用明胶包被并含有 MEF 培养液的培养皿上。

（5）细胞在 37℃，5%CO_2 条件下，孵育 2～6 天，生长至接近铺满培养表面时传

代扩增。

(6) 传代的小鼠胚胎成纤维细胞按常规方法进行冻存，或者将细胞接种在 $75cm^2$ 的培养瓶中，晃匀，用于后续实验。

2) 原代 MEF 细胞的体外传代培养

待细胞在培养皿中长至 80%～90%融合时，弃除旧的培养液，PBS 清洗，用 0.05%胰蛋白酶-EDTA 溶液消化，在转速 1000r/min 下离心 5min 收集细胞，弃上清并用小鼠胚胎成纤维细胞培养液重悬细胞，将细胞接种在 $175cm^2$ 的培养瓶中，摇匀后放置 37℃，5%CO_2 条件下培养。

3) MEF 细胞的冻存和复苏

(1) 冻存。

①原代和传代培养的 MEF 细胞（$175cm^2$ 培养瓶）弃去培养液，用 10ml PBS 清洗细胞。

②加入 5ml 胰蛋白液-EDTA，37℃下孵育 5min。

③轻拍培养瓶，使贴壁细胞松动，进入悬浮液。

④加入 10ml MEF 培养液，终止胰蛋白酶作用，转移到 50ml 离心管。1000r/min 离心 5min。

⑤弃去上清液，加入 5ml 新鲜 MEF 冻存液（含 10% FBS 和 10%DMSO 的 MEF 培养液），使沉淀的细胞块重新悬浮，用吸管上下吹打，形成单细胞悬液。

⑥将细胞悬浮液移至冻存管中，每管 1～1.5ml。

⑦放入冻存盒，置−70℃冰箱，第二天移入液氮长期保存，至少可以保存 4 个月。

(2) 复苏。

①从液氮中取出小鼠成纤维细胞的冻存管，在 37℃水浴中迅速解冻。

将细胞悬浮液转移到离心管，与事先加入的 MEF 培养液均匀混合，1000r/min，离心 5min。

②弃去上清液，用 20ml MEF 培养液使细胞团块重新悬浮，转移到用明胶包被过的 $175cm^2$ 培养瓶，加入培养液直至最后容积为 30ml。

③在 37℃下孵育 3～5 天，直到细胞铺满培养表面。

4) 饲养层细胞的制备

(1) 选择合适阶段的细胞：传代 3 ～5 次的原代培养细胞（P3～P5）。

(2) 培养皿需预处理：0.1%明胶处理至少 1h；

(3) 可用于获得滋养层细胞的两种处理方法：

①丝裂霉素 C 处理 MEF 细胞：待细胞生长至 80%融合时，弃去旧的培养液，加入含丝裂霉素 C（终浓度为 10 μg/ml）的小鼠胚胎成纤维细胞培养液继续培养 3～4h。处理完后，除去含丝裂霉素 C 的培养液，PBS 洗 5 ～7 遍，用 0.05% 胰蛋白酶-EDTA 消化，制成单细胞悬液。

②^{60}Co 照射 MEF 细胞：常规收集大量细胞，用小鼠胚胎成纤维细胞培养液重悬成单细胞悬液，^{60}Co 短暂照射，照射剂量为 55Gy。具体操作方法如下：

a. 弃去培养液，用 10ml PBS 清洗；

b. 加入胰蛋白酶溶液，孵育 5min。轻拍培养瓶，使贴壁细胞松动，进入悬浮液。

c. 用新鲜 MEF 培养液终止胰蛋白酶液作用，转移至离心管内，在 1 000r/min 下离心 5min。

d. 弃去上清液，用培养液悬浮细胞团，将悬液转移至另一个大离心管，置于冰上。

e. 照射剂量为 55Gy，短暂照射。

f. 在 1 000 r/min 下，离心 5 min，用新鲜培养液重悬细胞沉淀，按照 3×10^5～4×10^5 个/ml 的密度将细胞均匀接种在培养皿中，一般可以孵育一夜至 7 天，供胚胎干细胞培养用。在此步骤中得到的细胞悬浮液也可以按常规方法冻存。

MEF 的接种密度（planting density）对支持胚胎干细胞的生长十分重要，以下是建议的接种密度（表 11-1）。

表 11-1　MEF 的接种密度

培养皿种类	面积	MEF 数目
12 孔培养板	3.8cm^2/孔培养板	0.25×10^6/孔培养板
6 孔培养板	9.5 cm^2/孔培养板	0.5×10^6/孔培养板
100mm 培养皿	56 cm^2/培养皿	3.4×10^6/培养皿
T25 培养瓶	25 cm^2/培养瓶	1.2×10^6/培养瓶
T75 培养瓶	75 cm^2/培养瓶	4×10^6～5×10^6/培养瓶
T225 培养瓶	225 cm^2/培养瓶	12×10^6～15×10^6/培养瓶

2. 内细胞团的分离和培养

（1）第 4 天（交配后 3 天半）用预温的 37℃培养液把处于胚泡阶段的胚胎从子宫角两边的冲出，用无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 PBS 清洗，转移到盛有预温至 37℃的 Tyrode's 溶液（或 0.05%链霉蛋白酶）的直径 35mm 培养皿上。在解剖显微镜下观察，大约 5 min 后可见透明带溶解。

（2）将除去透明带的胚胎转移到盛有新鲜胚胎干细胞培养液和 10%FBS 的 35mm 培养皿内，37℃孵育 1h，再用免疫外科法去除外面的滋养细胞。步骤如下：

将胚胎和抗血清一同孵育 30min 后，用干细胞培养液清洗三次；胚胎与补体孵育 20min，干细胞培养液清洗三次；此时，内细胞团清晰可见，然后用尖端抛光的巴斯德吸管清理去除滋养细胞。

（3）仔细分离出整个内细胞团，将其接种在盛有干细胞培养液，且表面铺有新鲜制备的 MEF 饲养层的培养皿上。

（4）内细胞团接种在 MEF 饲养层后，在 37℃，5%CO_2 下培养大约 12h 内贴壁，一般于 24～48h 之内换一半新鲜的培养液。之后逐渐演化成胚胎干细胞样集落。每天更换一次新鲜培养液。

3. 胚胎干细胞的扩增和传代

（1）移去培养液，用 5ml PBS 清洗培养皿表面。

（2）弃去 PBS，加入 2ml 0.05%～0.25% 胰蛋白酶-EDTA，37℃下孵育 1～2min，轻轻拍打培养皿的一侧，使贴壁细胞松动，进入悬浮液。

(3) 加入5ml胚胎干细胞培养液，终止胰蛋白酶的作用。用吸管吹打成单细胞悬液。

(4) 在转速1000 r/min下，离心5min。用培养液重新悬浮细胞，计数细胞。

(5) 将适当数目的分散的单个细胞接种到新鲜配制（24h内接种）的胚胎成纤维细胞饲养层，37℃下孵育。以上操作称作第一次扩增，即第一次传代。

(6) 孵育过程中，密切观察细胞形态变化和细胞集落的形成。当集落直径超过100μm时，必须用胰蛋白酶-EDTA消化后传代扩增。避免集落直径超过400μm，此时细胞趋于分化。

(7) 随着传代次数的增加，细胞集落的数目增加，保持其直径为100～300μm，间距200～400μm，均匀分布在培养皿表面。用胰蛋白酶消化后，分散的单个细胞悬浮液，一部分转移到冻存管做长期储存，另一部分用于接种，继续传代，扩增。

(8) 一般以1∶8～1∶15的比例进行传代扩增。

注：内细胞团的细胞经上述步骤培养及传代后即可建立新的胚胎干细胞系；若从公司购买已经建系的胚胎干细胞，可按上述步骤长期体外培养及传代。

4. 小鼠ES细胞的复苏、传代及冻存

(1) 复苏：ES细胞从液氮中取出后投入37℃水浴中，快速振荡至融化，立即用ES细胞培养液稀释细胞悬液，1000 r/min，离心5min，弃上清，再用ES细胞培养液将细胞重悬，接种到预铺有饲养层的培养皿中，继续培养。

(2) 培养：ES细胞需每24h换液一次，并在倒置相差显微镜下观察细胞的生长状况。

(3) 传代：一般2～3天传代一次。弃旧培养液后，PBS清洗，加入37℃预温的0.05%～0.25%胰蛋白酶-EDTA，置37℃，消化约3～5min，之后加入新的ES细胞培养液，用1ml的枪头轻轻吹打细胞集落成单细胞。1000 r/min，离心5 min，弃上清，再用ES细胞培养液将细胞重悬，按照1∶8～1∶15接种到新的预铺有饲养层的培养皿中，补足培养液，晃匀，继续培养。

(4) 冻存：收集细胞的步骤同传代，用ES细胞培养液重悬细胞，缓慢地加入10% FBS和10%DMSO（冰上操作）的培养液，混匀，放入冻存管后置－70℃冰箱，第二天移入液氮长期保存。

5. 小鼠ES细胞的体外诱导分化（悬浮培养EB法）

收集ES细胞的步骤同传代，用EB培养液吹打成单细胞悬液，接种至10cm细菌培养皿悬浮培养3～4天，细胞启动自发分化形成折光性强的圆球状类胚体。收集细胞悬液至离心管中，令细胞团自然沉降或200r/min离心5min收集细胞团，此时可以加入合适的诱导液重悬细胞团，接种至培养皿继续贴壁培养并向相应类型的成熟细胞诱导分化。

【观察与结果】

1. 小鼠ES细胞的形态学观察

小鼠ES细胞呈复层隆起集落状生长，集落边缘清晰锐利，周边为被推开的已被处

理过的 MEF。典型 ES 细胞的细胞核圆形较大，核仁清晰，约 1～2 个，细胞质较少，核质比很高。经消化后悬浮培养 3～4 天可形成典型的类胚体。类胚体形态规则，圆形或椭圆形，折光性好，中央颜色较深，周边较透亮，边缘可见向外凸出的细胞轮廓（图 11-1）。

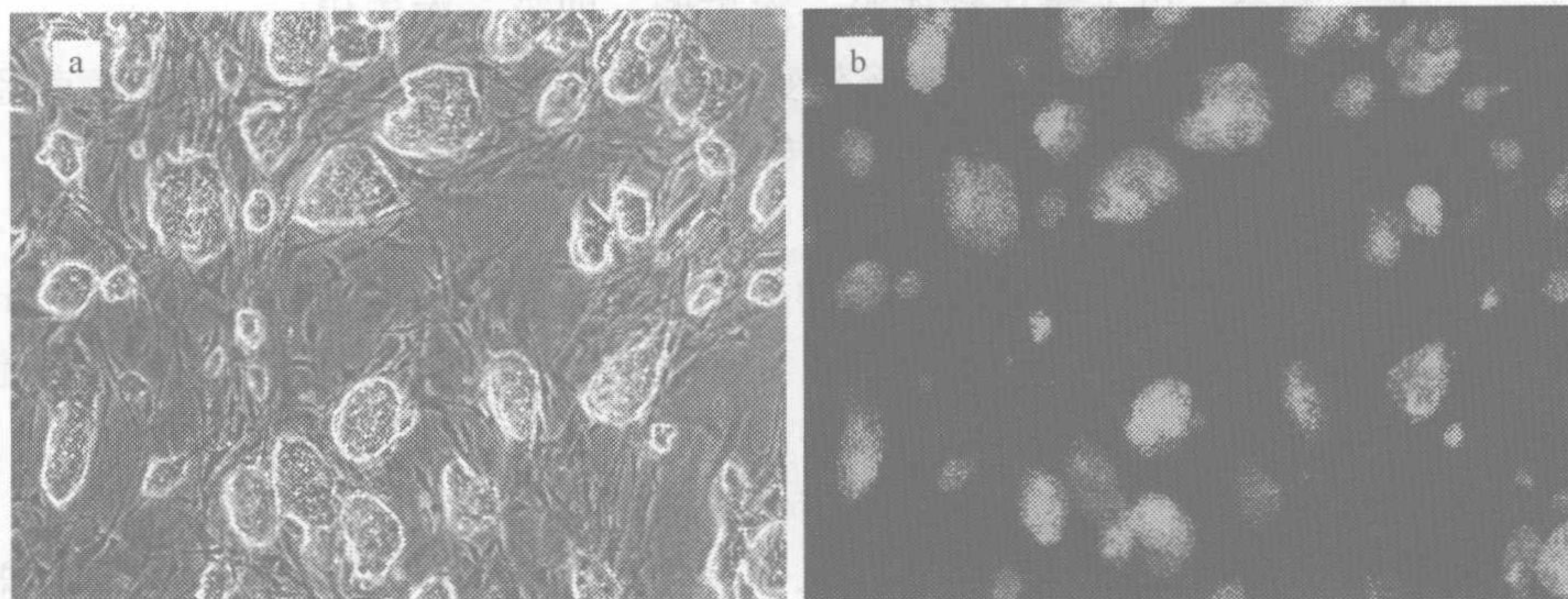


图 11-1 小鼠胚胎干细胞细胞集落群（a）和相应的碱性磷酸酶染色阳性（b）

2. 小鼠 ES 细胞的其他鉴定实验（图 11-2）

（1）免疫荧光染色：小鼠 ES 细胞表达特异的细胞质或表面抗原：

Oct4（＋） SSEA-1（＋） SSEA-3（－） SSEA-4（－）

（2）碱性磷酸酶活性检测：为阳性显色。

（3）体外分化能力检测：可形成三胚层来源的各种细胞。

（4）体内分化能力检测：可形成包含三个胚层来源组织的畸胎瘤（teratoma）。

（5）核型分析：ES 细胞应保持正常核型。

【注意事项】

（1）分离 ES 细胞的起始材料应选择胚泡期的胚胎。高质量的培养液和胚胎成纤维细胞饲养层是维持其未分化状态、多向分化潜能和二倍体核型的关键。为了建立永久细胞系要定期去除细胞集落中的异常细胞，并将较好的细胞系尽快冻存。

（2）小鼠 ES 细胞需每天换培养液，以维持其未分化状态。当培养液变成黄色时，必须更换新鲜培养液。

（3）小鼠 ES 细胞增殖迅速，切忌细胞过度生长。为了保持 ES 细胞不分化，必须每 2～3 天传代一次。特别当细胞集落铺满培养皿，细胞集落直径达到 200～400μm，间距 200～400μm 时，即要传代。传代时需要尽量吹打成单细胞。

（4）传代可以从 1∶8 到 1∶15，一般不超过 1∶15，过度稀释会影响细胞的生长增殖。

（5）ES 细胞对酸碱度十分敏感，孵育箱的 CO_2 浓度应保持在 5%。

（6）血清的质量非常重要。从不同小鼠种系培育出的 ES 细胞系对不同来源的血清反应不同。有的血清可能对有的 ES 细胞系有毒性，因而检验不同 ES 细胞系对来自不同公司的血清反应是必要的。

（7）建立新的 ES 细胞系相对容易，困难的是在扩增和传代过程中保持细胞株的稳

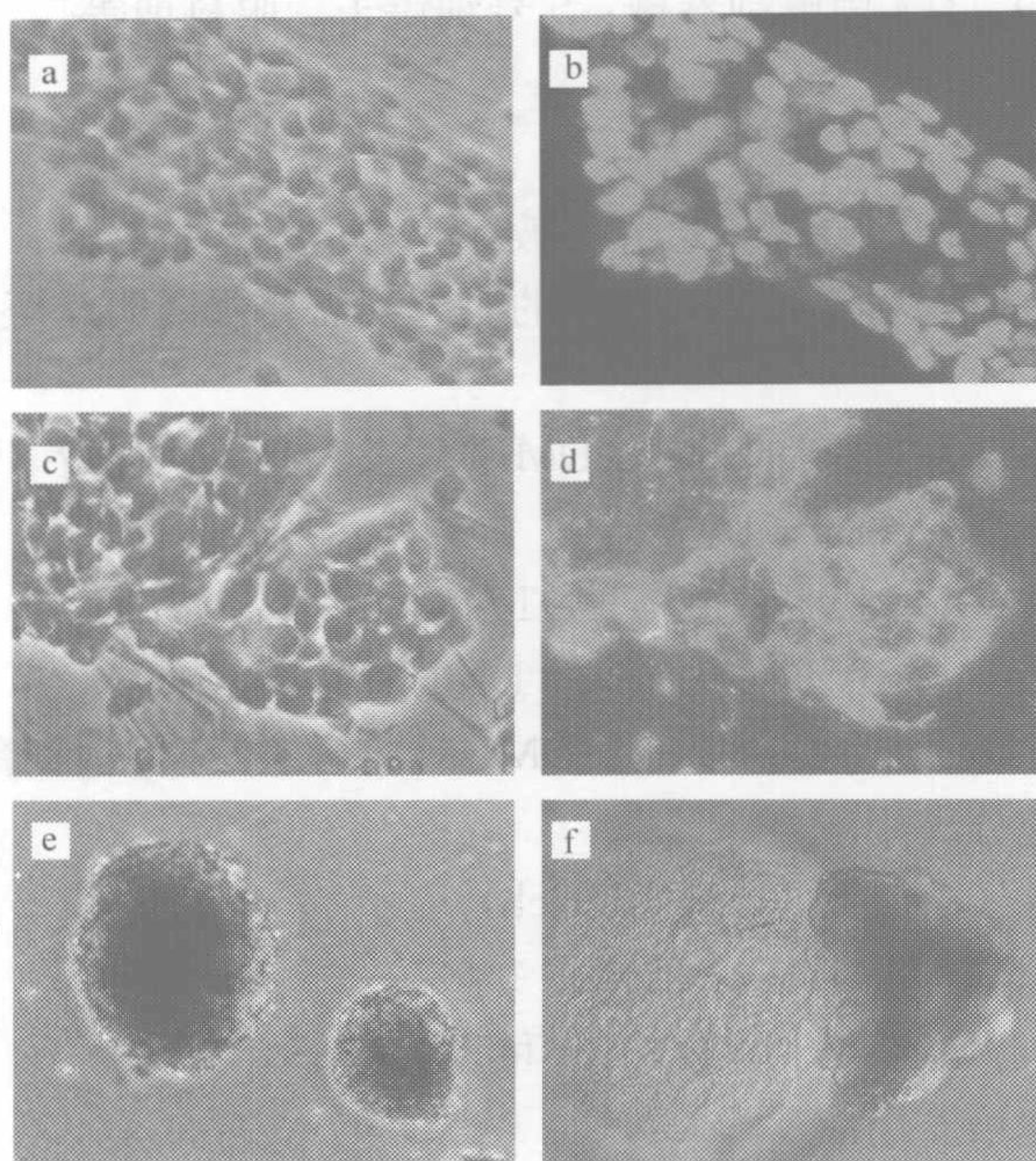


图 11-2　小鼠 ES 细胞的其他鉴定

a. 小鼠胚胎干细胞细胞集落；b. 显示 Oct-4 阳性；c. 小鼠胚胎干细胞细胞集落；d. 显示 SSEA-1 阳性；e. 经消化后悬浮培养 4 天形成典型的类胚体；f. 悬浮培养 10 天形成典型的类胚体

定性，正常染色体核型以及种系传递的能力。因此充分的细胞分子生物学鉴定是必要的。

（盖慧　马午）

11.1.2　人胚胎干细胞的分离和培养

【实验原理】

在胚胎干细胞培养和建立胚胎干细胞系的过程中，最重要和最关键的问题是保持胚胎干细胞的增殖和分化潜能，维持细胞处于未分化状态，这是胚胎干细胞的培养的技术难点。为了避免胚胎干细胞分化，已经建立了以下几种胚胎干细胞培养体系：即小鼠的饲养细胞层培养体系、人的饲养细胞层培养体系，以及无饲养细胞层和无血清培养体系。其中最常用的是小鼠饲养细胞层培养体系。本节所介绍的培养技术是我们应用小鼠饲养细胞层培养体系来培养人胚胎干细胞的经验。

【实验用品】

1. 仪器与用品

①超净工作台、5% CO_2 培养箱、离心机、解剖显微镜、倒置相差显微镜和荧光显微镜；②175 cm^2 培养瓶、100mm 细菌培养皿、0.22μm 微孔滤膜、巴斯德吸管、离心

管、移液管、冻存管；③无菌解剖器械：5 号细镊子、眼科剪等。

2. 试剂与配方

1）小鼠胚胎成纤维细胞分离、培养用液

(1) 0.1%明胶：所有培养皿和培养瓶的底部都需要预铺明胶至少 1h，再接种 MEF 细胞。

(2) 冻存培养液：新配制的 60% DMEM，20%胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）和 20%二甲基亚砜（DMSO）。

(3) 酶消化液：0.05%胰蛋白酶－EDTA。

(4) MEF 培养液：含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液。

(5) 丝裂酶素 C（mitomycin C）：用 DMEM 将丝裂霉素 C 稀释成 10μg/ml。

2）人胚胎干细胞分离用液

(1) 酸性 Tyrode's 溶液（Sigma-Aldrich）。

(2) 抗体：抗血清，用 DMEM 稀释成 1∶30。

(3) 补体蛋白：豚鼠补体，用 DMEM 稀释成 1∶10。

3）人胚胎干细胞培养用液

(1) 人胚胎干细胞培养液（无血清）（配制 500ml）

DMEM-F12	391ml
Knockout 血清替代物	100ml
非必需氨基酸	5ml
L-谷氨酰胺（1mmol/L）	2.5ml
β-巯基乙醇（0.1mmol/L）	1ml

碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，b-FGF）（4ng/ml）0.5ml（b-FGF 应在使用前加入，并过滤）。

青霉素/链霉素　　100U/ml

(2) 冻存培养液：60% DMEM，20%胎牛血清和 20%二甲基亚砜。

(3) 细胞扩增传代用液：1mg/ml 胶原酶，用人胚胎干细胞培养液稀释。

3. 实验材料

提供 MEF 的小鼠：怀孕 13～14 天昆明小鼠或 CF-1 小鼠。

【方法与步骤】

1. 小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）饲养层制备

方法同 11.1.1 小鼠胚胎成纤维细胞饲养层的制备。

MEF 饲养层在 100mm 的培养皿里可以孵育一夜至 7 天，供人胚胎干细胞培养用。

MEF 的接种密度对支持人胚胎干细胞的生长十分重要，表 11-2 是建议的接种密度。

表 11-2　MEF 的接种密度

培养皿种类	面积	MEF 数目
12 孔培养板	3.8cm²/孔培养板	0.35×10⁶/孔培养板
6 孔培养板	9.5 cm²/孔培养板	0.7×10⁶/孔培养板
100mm 培养皿	56 cm²/培养皿	4×10⁶～5×10⁶/培养皿
T25 培养瓶	25 cm²/培养瓶	2×10⁶～2.3×10⁶/培养瓶
T75 培养瓶	75 cm²/培养瓶	6×10⁶～7×10⁶/培养瓶
T225 培养瓶	225 cm²/培养瓶	18×10⁶～21×10⁶/培养瓶

2. 人胚胎干细胞的分离

1）免疫外科法（immunosurgical isolation）

（1）在立体显微镜下，将胚胎放入预热至 37℃的 Tyrode's 溶液里，当透明带开始溶解时，把胚胎取出，用新鲜的胚胎干细胞培养液洗涤三次。

（2）胚胎和抗血清一起孵育 30min 后，立即用新鲜的胚胎干细胞培养液清洗三次。

（3）胚胎和补体孵育 20min，外面的滋养细胞溶解，胚泡的内细胞团可以明显被辨识。

（4）用细吸管清理，去除滋养细胞，用新鲜的干细胞培养液清洗整个内细胞团三次。

（5）将整个内细胞团接种于 100mm 培养皿，加入人胚胎干细胞培养液。培养皿的表面预铺一层新鲜制备（24h 内）的 MEF 饲养细胞。

2）机械分离

在上述去除透明带的胚胎中，如果内细胞团可以在显微镜下辨别，则用一个细的注射针头（27G）或者细吸管将滋养细胞尽量清除。如果看不清内细胞团，则把整个胚胎放在小鼠胚胎成纤维细胞层上培养。

3. 人胚胎干细胞的扩增和传代

人胚胎干细胞的扩增和传代是培养具有原始多能性而又保持未分化能力的胚胎干细胞的关键步骤。常用的方法包括胶原酶法（collagenaseⅣ）、胰蛋白酶法和机械操作法。本节介绍胶原酶法，因为胶原酶作用温和，保持细胞成活和生长较好，适用于大量干细胞传代。典型的人胚胎干细胞系分离和培养过程如图 11-3。

（1）在人胚胎干细胞传代前 24h，准备 3～5 个预铺 MEF 饲养层的 100mm 培养皿。

（2）内细胞团接种在 MEF 饲养层后，逐渐演化成胚胎干细胞样集落。每天更换一次新鲜培养液。当胚胎干细胞集落在 MEF 饲养层上扩增到一定程度后，应及时传代，弃去旧培养液，3ml PBS 清洗。

（3）加入 3ml 含有胶原酶Ⅳ（1mg/ml）的人胚胎干细胞培养液后，放回 37℃培养箱，孵育大约 30min。

（4）显微镜下密切观察胚胎干细胞集落。如果细胞集落的边缘刚开始卷起，则胶原酶孵育的时间要适当延长，直到整个细胞集落从饲养细胞层上脱落。

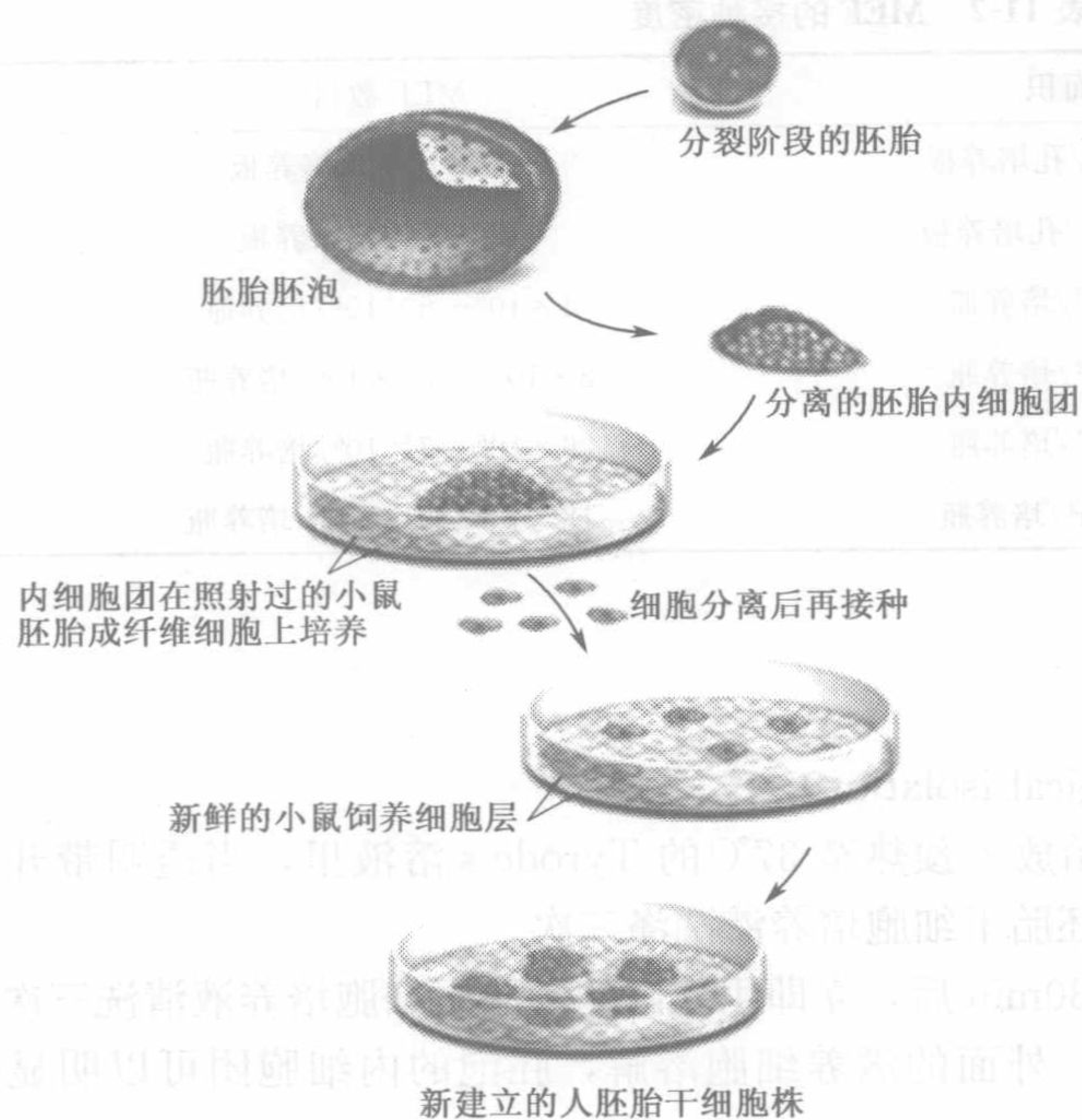


图 11-3　人胚胎干细胞系的分离和培养过程示意图

(5) 加入 6ml 人胚胎干细胞培养液，用 10ml 吸管将脱落漂浮的胚胎干细胞集落和悬浮液一起转移到 15ml 离心管内，1000r/min 离心 3～5min。也可以让胚胎干细胞集落在悬浮液中自动沉淀。

(6) 弃去上清液，用 10ml 新鲜人胚胎干细胞培养液将细胞重新悬浮。用 5ml 的吸管轻轻吹打细胞集落成碎片，但是不要吹打成单细胞。

(7) 将从每一个培养皿收集细胞悬浮液接种到 3～5 个预铺 MEF 饲养层的 100mm 培养皿，培养皿里加入约 10ml 培养液。

(8) 不同的胚胎干细胞系生长的速度不同，在 37℃下，大约 4～7d/代。

4. 人胚胎干细胞的冻存和复苏

1) 冻存

(1) 弃去旧培养液，用 3ml PBS 清洗。

(2) 加入 3ml 含有胶原酶（1mg/ml）的人胚胎干细胞培养液，孵育大约 30～40min，直到整个细胞集落从饲养细胞层脱落下来。

(3) 加入 6ml 人胚胎干细胞培养液，用 10ml 吸管将脱落漂浮的胚胎干细胞集落和悬浮液一起转移到 15ml 离心管内，在 1000r/min 转速下离心 3～5min。

(4) 弃去上清液，用 1～2ml 新鲜制备的冻存培养液，重新悬浮细胞。

(5) 将细胞悬浮液加入冻存管，每个冻存管可保存大约一个 100mm 培养皿里的 ES 细胞。放入冻存盒后置－70℃冰箱，第二天移入液氮长期保存。

2) 复苏

(1) 从液氮中取出冻存管，37℃水浴中解冻。

(2) 吸管重新悬浮细胞，转移到 15ml 离心管，管内事先存有 10ml 新鲜人胚胎干细胞培养液，1000r/min 离心 5min。

(3) 弃去上清液，用 3ml 新鲜人胚胎干细胞培养液重新悬浮细胞。

(4) 接种至预铺 MEF 饲养层的 100mm 培养皿。

(5) 37℃下培养，直至下一次传代，传代后 24h 应换一次新鲜人胚胎干细胞培养液。

3）人胚胎干细胞培养的常规维持

（1）每天更换一次新鲜培养液。

（2）每 4～6 天传代一次，传代的细胞直接接种在预铺 MEF 饲养层的培养皿上。

（3）传代时要用机械分离法去除已经分化的细胞集落。

【观察与结果】

正常人胚胎干细胞呈集落生长，形似鸟巢，边缘清楚，细胞排列紧密，较小，形态不规则，核大，核质比高。对长期培养过程中的人胚胎干细胞进行全面详细的鉴定是保证获得高质量胚胎干细胞系的重要手段。常用的鉴定包括如下五个方面。

（1）原始多能性：包括利用类胚体和畸胎瘤的形成来检验分化成三胚层细胞的能力；胚胎干细胞定向分化以及细胞基因组和基因表达分析（DNA microarray and q-RT-PCR analyses）。

（2）保持未分化能力：采用碱性磷酸酶染色（alkaline phosphatase staining）、端粒酶活性分析（telomerase activity）、细胞基因组和基因表达分析、免疫细胞化学染色和流式细胞仪（FACS）检测细胞表面标志物的表达。用免疫细胞化学染色来检测分析人胚胎干细胞表达的特异性标志物，有 SSEA-3、SSEA-4、肿瘤识别抗原-1-60（TRA-1-60）、TRA-1-81 和 OCT-4 应呈阳性而胚胎阶段特异性抗原-1（SSEA -1）呈阴性（图 11-4）。

（3）细胞系的独立性：为了防止动物种系和细胞系之间的交叉污染，有必要监测分析短串联重复顺序（short tandem repeats，STR）和人白细胞抗原（ human leukocyte antigens，HLA）。

（4）细胞系的稳定性：由于胚胎干细胞系长期多次扩增和传代，有必要经常进行染色体核型、线粒体 DNA 和甲基化（methylation）分析。

（5）无病原体污染：检验是否有细菌、病毒、真菌和支原体（mycoplasma）感染。

【注意事项】

（1）人胚胎干细胞培养过程应当每天更换一次新鲜培养液。偶尔（比如周末）加两倍体积的新鲜培养液，可以在 48h 内不换培养液。

（2）明胶包被的培养瓶和培养皿可以事先准备，储藏在室温下或37℃的孵育箱里。

（3）成纤维细胞一般从孕 13～14 天的小鼠胚胎分离并传代。最适用于饲养层的成纤维细胞取自 3～6 代，因为 3 代以前分离出来的成纤维细胞纯度不高，6 代以后，成纤维细胞衰老，失去维持胚胎干细胞未分化的能力。用做饲养层的 MEF 细胞的密度也很重要。如果 MEF 细胞密度太低，胚胎干细胞不能很好地贴壁且容易分化；如果 MEF 细胞过密，整个 MEF 饲养层容易从培养皿壁上脱落且胚胎干细胞也容易分化。

（4）在人胚胎干细胞的培养过程中，必须密切观察干细胞的形态和密度变化。单个胚胎干细胞具有明显的细胞核，高核质比，并紧密排列在有清晰边缘的集落里。每个集落应含有 300～500 个细胞，在一个 100mm 的培养皿里应保持有几百个集落。如果集落数目太少，干细胞生长将十分缓慢，而过于拥挤的集落也会促进胚胎干细胞分化。

（5）所有人胚胎干细胞培养液和冻存液需保存在 4～8℃，不要超过 5 天；胚胎牛血清可以保存在 4～8℃，不超过两周。豚鼠补体储藏不要超过 8 个月，否则会产生毒性。

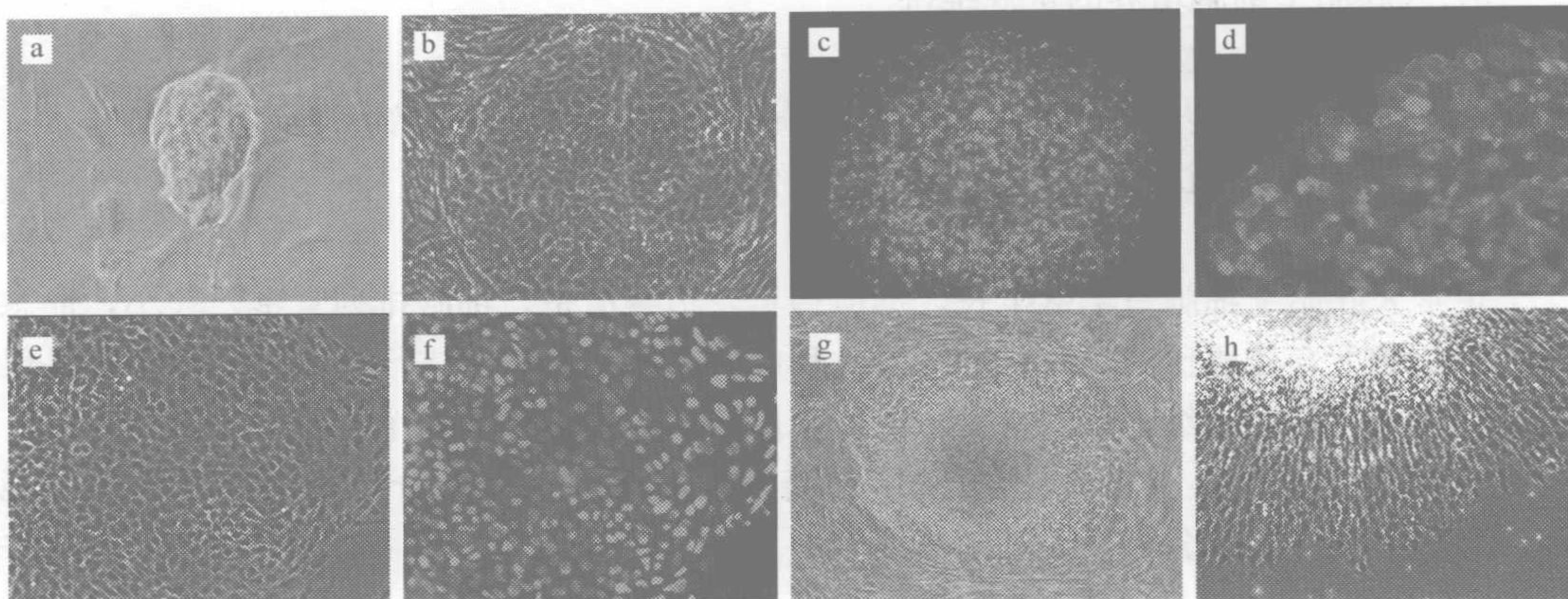


图 11-4　人胚胎干细胞的分离、培养和分化

a. 先使用免疫外科法，再用细吸管清理去除滋养细胞，将整个内细胞团接种在小鼠胚胎成纤维细胞层上；b. 由内细胞团衍生出的健康干细胞集落，生长在小鼠胚胎成纤维细胞层上；c. 人胚胎干细胞集落显示碱性磷酸酶染色阳性；d. 显示 SSEA-4 阳性；e，f. 人胚胎干细胞集落显示 Oct-3/4 阳性；g. 胚胎干细胞集落的中心出现“火山口”状结构、这是中心细胞开始分化的迹象；h. 从胚胎干细胞集落分化出来的细胞群

（马午）

11.1.3　人类胚胎干细胞定向分化成神经细胞

【实验原理】

由于许多成体干细胞在组织器官内量很少，缺乏特定的标记物，使其分离、纯化和增殖十分困难。具有原始多能性的胚胎干细胞可以产生几乎人体内所有的细胞类型，因而具有巨大的治疗潜力。但在应用于临床之前，胚胎干细胞通常需先分化成特定组织的干细胞。因此定向分化人胚胎干细胞，生产大量有治疗价值的各类组织干细胞引起人们极大的兴趣。

细胞分化是基因选择性表达的结果，寻找控制基因表达和诱导胚胎干细胞分化的因子成为干细胞研究的重要课题。近年来，胚胎干细胞定向分化成神经干细胞（neural stem cell）和神经祖细胞（neural progenitor），进而分化成各类神经细胞的研究取得了进展。神经定向分化通常先使用不贴壁（low attachment）的培养皿悬浮培养，胚胎干细胞会自动形成细胞团（aggregate）或类胚体。在神经分化培养液（neural differentiation medium）的诱导下，类胚体内会形成花饰状细胞群（neural rosettes）。这种花饰状细胞群表达的基因和蛋白标记物与早期人胚胎神经管中神经外胚层细胞（neuroectodermal cell）表达得很类似，因而被认为类似于早期胚胎神经上皮细胞（neuroepithelial cell）的前体。将这种初步分化的类胚体移种在 Poly-D-Lysine/laminin 包被的培养皿表面上，花饰状细胞群将近一步分化成 nestin、A2B5 和 PSA-NCAM 阳性的神经祖细胞，继而分化成神经元（neuron）、星型胶质细胞（astrocyte）和少突胶质细胞（oligodendrocyte）。本实验将介绍这种先悬浮，然后贴壁的培养诱导分化方法。

【实验用品】

1. 实验器材

(1) 75cm² 培养瓶、6 孔培养板、24 孔培养板、100mm 细菌培养皿、100mm 不贴壁的培养皿、锥形离心管、移液管、冻存管 和 9in① 巴斯德吸管。

(2) 无菌解剖用具。

(3) 空气层析室、5% CO_2 培养箱、离心机、解剖显微镜、倒置相差显微镜和荧光显微镜。

2. 试剂与配方

(1) 人胚胎干细胞培养液（无血清培养液）（配制 500ml）：

DMEM-F12　391ml
Knockout 血清替代物　100ml
非必需氨基酸　5ml
L-谷氨酰胺（1 mmol/L）　2.5ml
β-巯基乙醇（0.1mmol/L）　1ml
青霉素/链霉素　100U/ml
碱性成纤维细胞生长因子（4ng/ml）0.5ml 应在使用前加入。

(2) 干细胞扩增传代培养液：1mg/ml 胶原酶，用人胚胎干细胞培养液稀释。

(3) 神经分化培养液：

DMEM/F12　(Gibco, Invitrogen)
N2 添加剂　(Gibco, Invitrogen)
L-谷氨酰胺　2 mmol/L
青霉素/链霉素　50U/ml
碱性成纤维细胞生长因子（b-FGF）15ng/ml

(4) Neurobasal/B27 培养液（Gibco, Invitrogen）培养液应储存在 4℃，不超过两周。

(5) 其他试剂：聚 D-赖氨酸，层粘连蛋白。

3. 实验材料

(1) 经过严格鉴定的人胚胎干细胞系：TE03、TE06、H1 或 H9。

(2) 提供胚胎纤维母细胞的小鼠：怀孕 13～14 天昆明白母鼠或者 CF-1 小鼠。

【方法与步骤】

1. 准备聚 D-赖氨酸/层粘连蛋白包被的培养皿

(1) 用蒸馏水稀释聚 D-赖氨酸至最后浓度为 20μg/ml。在 37℃下用此包被 100mm 培养皿 5h。吸出多余的聚 D-赖氨酸后，用蒸馏水清洗后，干燥。

---

① 1in=2.54cm。

(2) 用蒸馏水稀释层粘连蛋白至最后浓度为 20μg/ml。在 37℃下用此包被已浸过聚 D-赖氨酸的培养皿 5h。吸出多余的层粘连蛋白后，用蒸馏水清洗后，干燥。

2. 形成细胞团或类胚体

(1) 将胚胎干细胞接种到预铺有小鼠胚胎成纤维饲养层细胞（MEF）的 100mm 培养皿中，培养一周后，从铺满胚胎干细胞的培养皿中弃去培养液，用 PBS 清洗。

(2) 加入 3ml 含有胶原酶液（1mg/ml）的人胚胎干细胞生长培养液，在 37℃下孵育 15～20min。

(3) 加入 6ml 新鲜人胚胎干细胞生长培养液，用 10ml 吸管上下吹打。将细胞悬浮液收集到 15ml 离心管内，在 1000r/min 下，离心 5min。

(4) 弃除上清液，用 10ml 新鲜的人胚胎干细胞生长培养液使细胞块重新悬浮。

(5) 将细胞悬浮液接种到 100mm 不贴壁的培养皿内，用人胚胎干细胞生长培养液培养 5 天。每天应更换新鲜培养液。细胞团或类胚体应在悬浮液中形成。

3. 神经祖细胞的形成（图 11-5）

(1) 将在不贴壁的培养皿内培养 5 天的类胚体转移到盛有 10ml 神经分化培养液的培养皿内再培养 10 天。此时，许多花饰状细胞群形成。

(2) 将在不贴壁的培养皿内和神经分化培养液中培养 10 天的类胚体转移到聚 D-赖氨酸和层粘连蛋白包被的 100mm 培养皿。类胚体逐渐贴壁，由神经外胚层细胞（neuroectodermal cell）组成的花饰状细胞群可能在表面更显著。免疫荧光细胞化学染色显示 Sox1 和 nestin 阳性。

(3) 当类胚体贴壁后几小时后，花饰状细胞群向外扩展，形成不规则的多极神经祖细胞。这时每两天更换一次新鲜的神经分化培养液。

(4) 3～5 天后，用免疫荧光细胞化学染色，大量的 nestin、A_2B_5 和 PSA-NCAM 阳性细胞群形成。少数的 TuJ1 阳性的神经元常常接着出现。

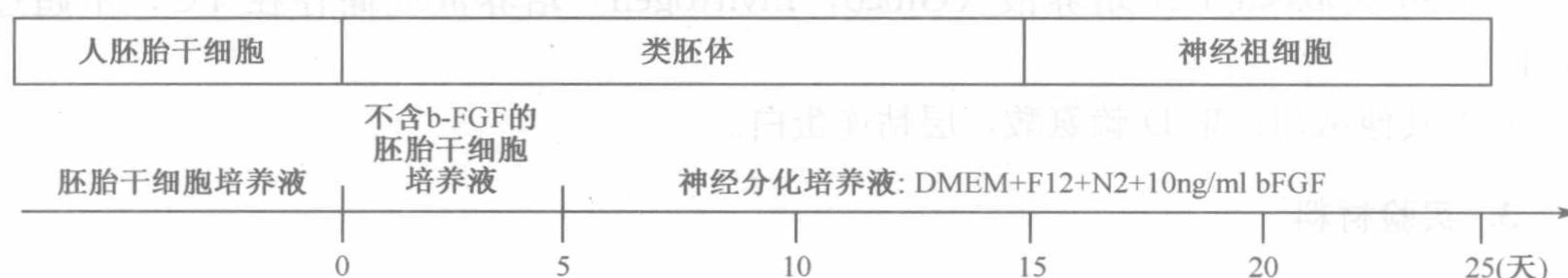


图 11-5　人类胚胎干细胞定向分化成神经祖细胞过程的示意图

4. 神经祖细胞进一步分化成神经元和神经胶质细胞

(1) 加入含有胶原酶的神经分化培养液，孵育 15～20min。直到细胞群从壁上脱落。

(2) 将脱落的细胞群收集到 15ml 离心管内。用 10ml 吸管上下吹打数次。

(3) 用 5ml 神经分化培养液清洗，在 1000r/min 下，离心 2min。

(4) 弃去上清液，用 5ml 含有 15ng/ml b-FGF 的 Neurobasal/B_{27} 培养液重新使细胞悬浮。用吸管吹打，使之成为单细胞悬液。

(5) 计数细胞，将 5×10^5 细胞接种在聚 D-赖氨酸/层粘连蛋白包被的 100mm 培养皿上。

(6) 37℃孵育，每 3～5 天更换一半含有 b-FGF 的新鲜 Neurobasal/B_{27} 培养液。

【观察与结果】

当类胚体在聚 D-赖氨酸/层粘连蛋白包被的培养皿上贴壁后 3h，神经祖细胞开始出现。少数神经元可以在几天后出现，但是星型胶质细胞和少突胶质细胞出现得很晚。在 Neurobasal/B_{27} 培养液内，神经祖细胞继而分化成神经元，星型胶质细胞和少突胶质细胞（图 11-6）。其细胞形态和功能可以用如下方法鉴定。

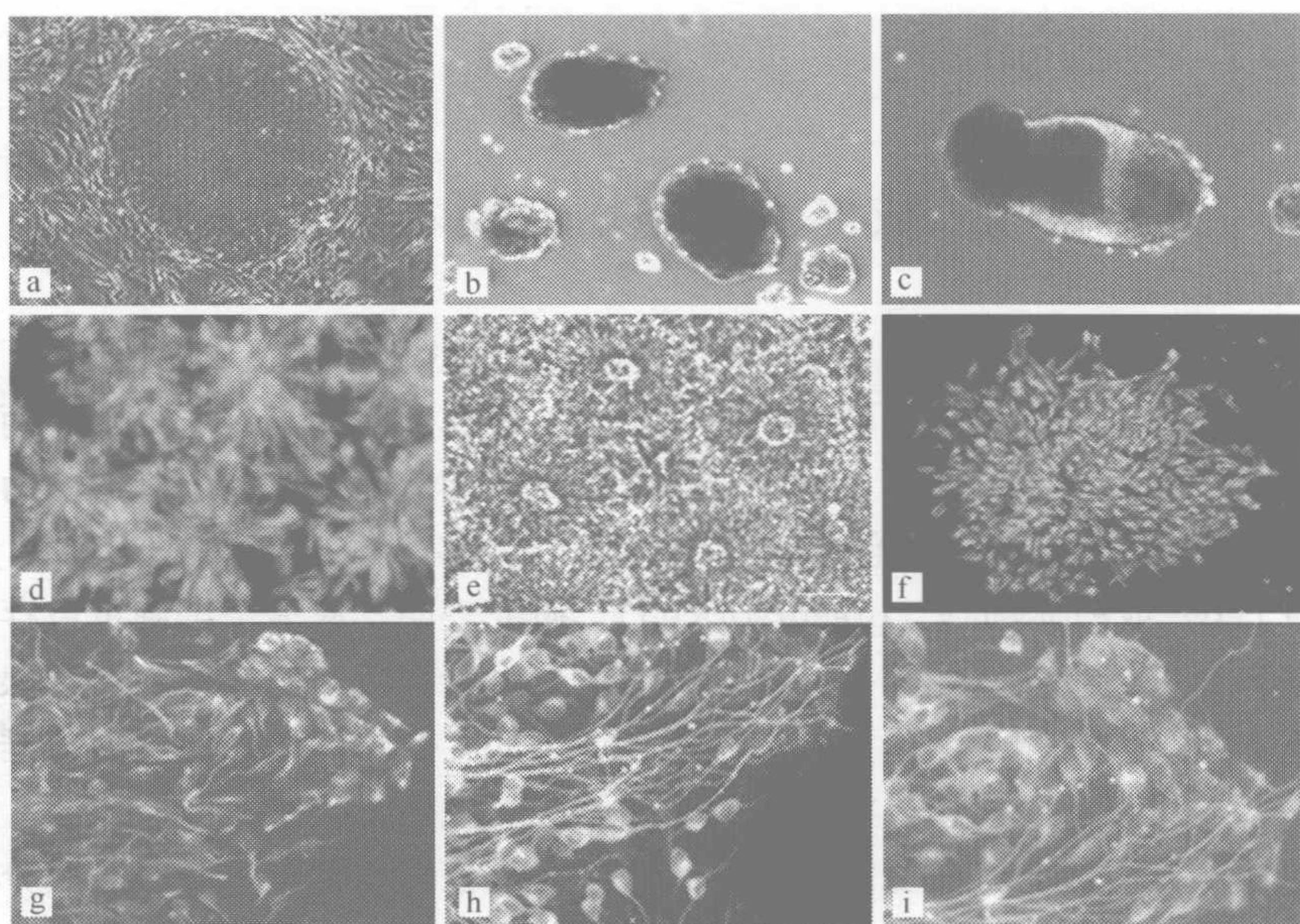


图 11-6 人类胚胎干细胞分化成神经祖细胞和神经细胞

a. 由内细胞团衍生出的健康干细胞集落，生长在小鼠胚胎成纤维细胞层上；b. 经消化后悬浮培养 5 天，形成的类胚体；c. 然后在神经分化培养液里培养 10 天；d～e. 类胚体转移到聚-D-赖氨酸和层粘连蛋白包被的培养皿后，贴壁分化出来的花饰状神经外胚细胞群（neuroectodermal cell）；用免疫荧光细胞化学方法染色 显示 sox1/nestin 阳性的花饰状细胞群（d）。f. 花饰状细胞群近一步分化成 nestin 阳性的神经祖细胞；g～i. 用免疫荧光细胞化学方法染色 显示 在同一区域的神经祖细胞群显示 nestin（g）和神经细胞显示 TuJ1 阳性（h）；i. g 和 h 放大后重叠起来照片

(1) 使用合适的抗体和免疫荧光细胞化学方法，可以把神经祖细胞，神经胶质祖细胞以及神经元，星型胶质细胞和神经少突胶质细胞区分开来。

抗 Nestin-标记神经干细胞和神经祖细胞；抗 Sox1-标记花饰状细胞群；

抗 A_2B_5-标记神经元祖细胞/神经胶质祖细胞（neuroglial progenitor）；

抗 PSA-NCAM -标记神经干细胞和神经祖细胞；

抗 β-Tubulin（TuJ1）-标记刚分化的神经元；

抗 MAP2-标记成熟神经元；抗 O_4-标记分化中的少突胶质细胞；

抗 GFAP-标记星型胶质细胞。

(2) 神经元突触功能的鉴定：成熟神经元在几周后会形成功能网路（functional network）。用膜片钳技术可以记录出动作电位和突触后膜电流。

【注意事项】

(1) 将在神经分化培养液中培养 10 天的类胚体转移到聚 D-赖氨酸和层粘连蛋白包被的 100mm 培养皿之前，要温和离心，不要把类胚体分离成单个细胞。

(2) 神经分化培养液中培养的类胚体在层粘连蛋白包被的培养皿中贴壁后，花饰状细胞群的形成可能不显著，但是类胚体仍然可以分化成大量的 nestin 阳性神经祖细胞。

（马午）

11.2　成体干细胞培养技术与方法

成体干细胞（adult stem cell）来源于机体组织，相比胚胎干细胞研究，其存在较少的伦理争议，是干细胞研究领域的另一个热点。成体干细胞具有干细胞的两个基本特征：一个是长期自我复制的能力，另一个是能分化成相应类型成体细胞的能力。在分化为成熟体细胞之前，成体干细胞可以产生一个或者多个中间细胞类型，称为祖细胞（progenitor cell）或前体细胞（precursor cell）。研究表明，成体干细胞可以存在于全部三个胚层发育而来的组织，如脑、骨髓、外周血、血管、骨骼肌、肝脏、胰腺以及皮肤等组织。正常组织内成体干细胞数量稀少，在体内的主要功能是一定程度上维持细胞功能的稳定状态，代替由于损伤或疾病而死亡的细胞。成体干细胞难于被识别、鉴定及纯化，其起源也不太清楚。目前鉴定成体干细胞主要是依赖于细胞表面标志及分析其体内体外分化能力。某些研究报道一些成体干细胞有分化为非其来源的组织的能力，这被称为可塑性，但是证据非常有限，对此科学界仍存在争议。

本节我们主要介绍成人骨髓间充质干细胞，新生儿脐带血造血干细胞及大鼠胚胎脑神经干细胞的分离培养及鉴定。

11.2.1　成人骨髓基质干细胞培养、纯化及鉴定

【实验原理】

长期以来，若干研究表明哺乳动物的骨髓中可能含有三个干细胞群：造血干细胞、基质干细胞和内皮前体细胞。骨髓基质干细胞是一个混合的细胞群体，为造血干细胞分化提供合适的内部环境，同时具有形成软骨、骨和脂肪细胞等的多种分化潜能，有学者亦称其为骨髓间充质干细胞（mesenchymal stem cell，MSC）。骨髓间充质干细胞易于从骨髓标本中分离培养并长期传代，可以分化为多种组织细胞，而且较胚胎干细胞而言无致瘤性且伦理争议较少，因此成为干细胞研究领域的一个热点，在若干基础研究及临床治疗组织器官损伤和退行性疾病方面具有重要的应用前景。目前关于骨髓间充质干细

胞的生物学特性仍存在很多争议，尤其是关于其分化和转分化潜能方面。本实验利用淋巴细胞分离液（Ficoll）从成人骨髓标本中分离单个核细胞，同时加入适宜骨髓间充质干细胞生长的培养液贴壁培养及反复传代，可获得生长状态良好的间充质干细胞并可进一步利用单克隆法筛选纯化该细胞。

【实验用品】

1. 仪器与用品

（1）CO_2 培养箱、超净工作台、高速离心机、倒置相差显微镜。

（2）培养瓶/培养皿、离心管、移液管、冻存管、10ml 注射器等。

2. 试剂与配方

（1）培养基：79%DMEM、20% 胎牛血清 FBS、0.2mmol/L 谷氨酰胺、1% 非必需氨基酸、100U/ml 青霉素/链霉素。

（2）0.1% 明胶（gelatin）：明胶粉 0.5g 溶于 50ml 生理盐水中，高压灭菌 30min。

（3）肝素抗凝液：肝素（12 500U/支）稀释于 50ml 无菌 PBS，4℃保存。

（4）淋巴细胞分离液（Ficoll）：上海精益化学试剂或 Sigma，4℃避光保存。

（5）细胞消化液：0.05% Trypsin-EDTA（Gibco）。

（6）其他实验试剂：0.1% 明胶（gelatin）、肝素抗凝液、无菌 PBS、二甲基亚砜（DMSO）等。

3. 实验材料

健康成人骨髓标本。

【方法与步骤】

1. 细胞密度梯度分离（Ficoll）法

（1）以临床自愿者为对象，局部麻醉下用 10ml 注射器（内含 5ml 已稀释的肝素）从髂后棘抽取 5ml 骨髓，已稀释的肝素与抽取的骨髓标本量为 1∶1。

（2）在一无菌离心管中加入淋巴细胞分离液（Ficoll），将抽取的骨髓标本缓缓加在分离液的上部，两者的比例为 1∶1，离心，3000r/min，30min。

（3）轻轻取出离心管，管内液体分为三层，用移液管吸取中间的单个核细胞层，加入无菌 PBS 清洗两次，1000r/min，5min，弃上清。

（4）将分离所获的细胞经台盼蓝染色后计数，按 2×10^5 个/cm^2 密度接种于培养瓶或培养皿中，培养瓶或培养皿中预铺 0.1% 明胶。

（5）接种后 48～72h 首次换液，之后每 2～3 天换液，7～10 天细胞增殖达 90%融合后首次传代。

（6）传代时使用 0.05% 胰蛋白酶-EDTA 消化，37℃，3～5min，一般 1∶2～1∶3 传代，传代后每 2～3 天换液，细胞生长达 80%～90%融合后再次传代。

（7）可将多余的细胞冻存。细胞经消化和离心收集后，培养液重悬，缓慢地加入 10% FBS 和 10%DMSO（冰上操作），混匀，4℃平衡 30min 后置－70℃冰箱，第二天

移入液氮长期保存。

2. 单克隆法纯化细胞

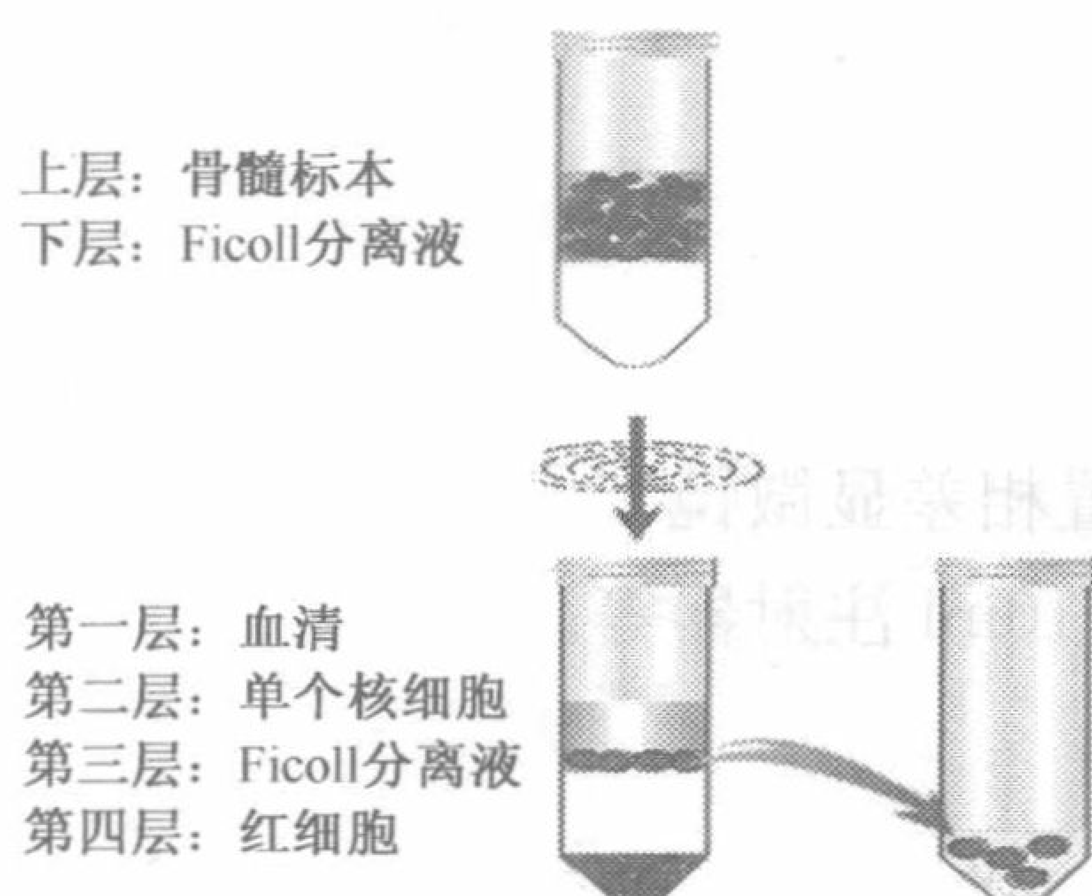


图 11-7　骨髓单个核细胞的分离（Ficoll 分离法）

试管内先加入 Ficoll 分离液，再沿管壁缓缓加入骨髓标本。2000r/min 离心 30min，可见试管内的液体分为明显的四层。从上至下分别为：血清层、单个核细胞层、Ficoll 分离液层、红细胞层。用移液管吸取中间的单个核细胞层后继续培养

（1）取早期代数（1～3 代）的细胞，0.05%胰蛋白酶-EDTA 消化，37℃，3～5min，吹打混匀成单细胞悬液，显微镜下直接挑取单个细胞分别接种至 96 孔板的各个孔中。或者采用有限稀释法接种。96 孔板中预铺 0.1% 明胶。

（2）3～4 天后逐天观察 96 孔板的各个孔，标记已有的细胞克隆，待细胞生长至 80%～90%融合后传代，通过多次传代筛选生长良好的单克隆。

【观察与结果】

1. 细胞密度梯度分离（Ficoll）法

可将骨髓标本分为三层：上层为血清层，透明澄清；中间层为单个核细胞层，白色薄膜状；下层为红细胞层，细胞沉淀为一红色致密较厚层（图 11-7）。

2. 骨髓间充质干细胞的鉴定

（1）形态学观察：骨髓间充质干细胞贴壁生长，首次分离接种后约 48h 可见克隆形成，约 3～4 个细胞，细胞呈细长纤维状、短梭形或小三角形。长期传代后细胞呈较均一的成纤维细胞样，生长密度高时可形成漩涡状。高倍镜下观察，细胞核圆形较大，核仁清晰，约 1～2 个（图 11-8）。

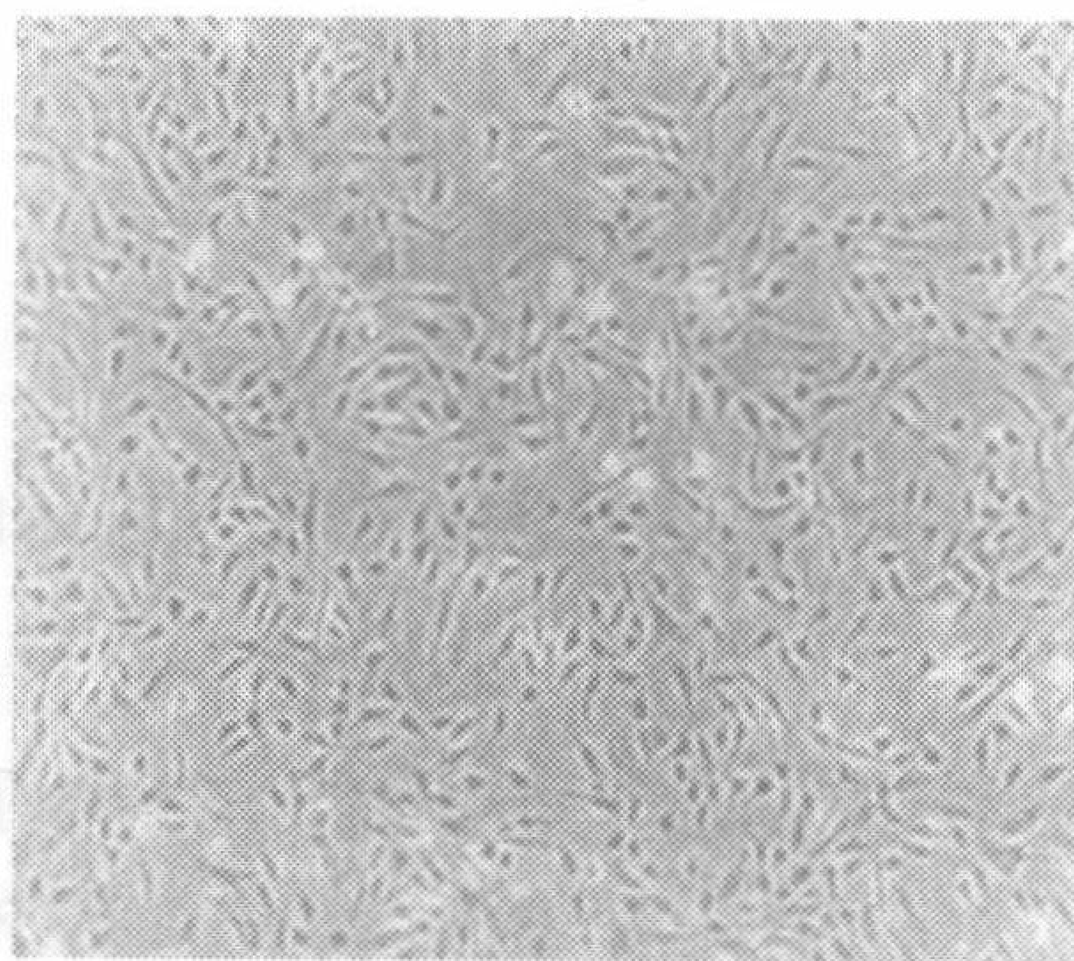


图 11-8　培养所获得的基质干细胞
细胞呈较均一的成纤维细胞样

（2）流式细胞仪（FACS）检测：骨髓间充质干细胞不表达造血干细胞的特异性标志物，如 CD34 和 CD45，而阳性表达 CD10、CD49b 等（图 11-9）。

（3）细胞分化能力检测：在特定条件的诱导下，骨髓间充质干细胞可以分化形成骨、软骨和脂肪细胞等（图 11-10）。

【注意事项】

（1）骨髓标本采集时应注意无菌操作，将标本加入离心管时动作要快，如果有必要可以在酒精灯旁边加入。

（2）细胞密度梯度分离（Ficoll）法分离骨髓标本时，应将标本缓缓加到分离液的上层，注意两层要分开，切勿混层。

（3）分离获得的细胞首次接种后一般 48～72h 换液，以利于间充质干细胞充分贴壁生长。也有研究者主张 24h 即换液。

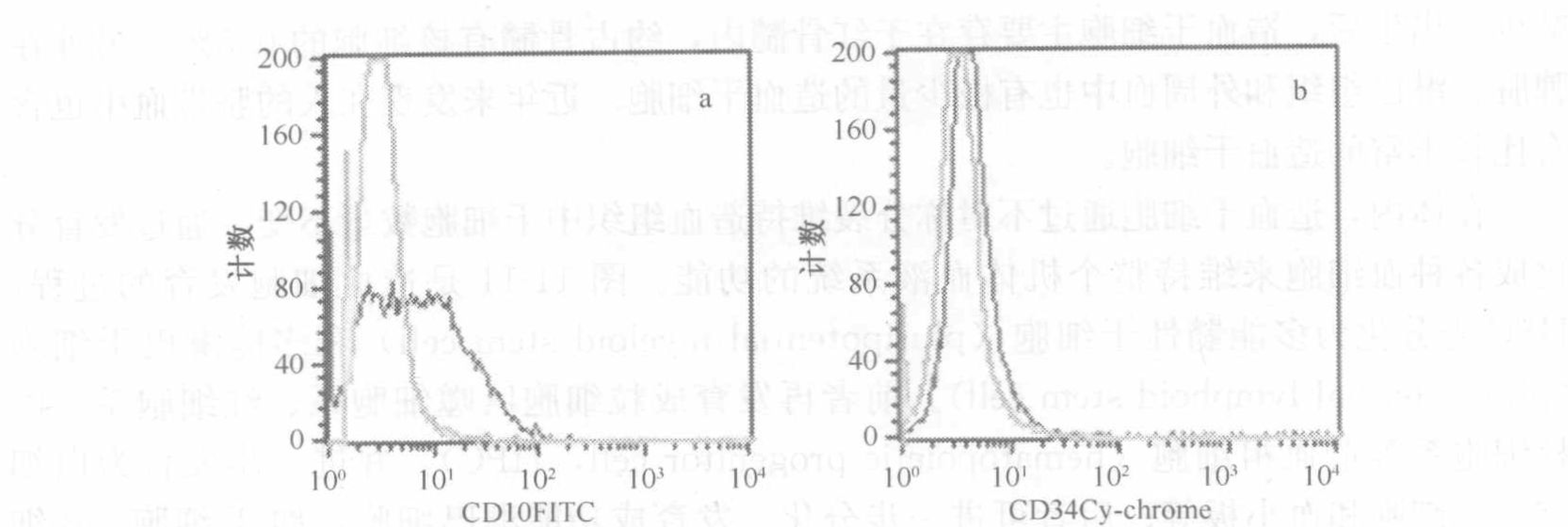


图 11-9　流式细胞仪检测细胞表面标志物的表达

骨髓基质干细胞不表达造血干细胞的特异性标志物，如 CD34，而阳性表达 CD10。a. 骨髓基质细胞表达 CD10；b. 细胞不表达 CD34。浅色曲线为同型对照，深色曲线代表标本

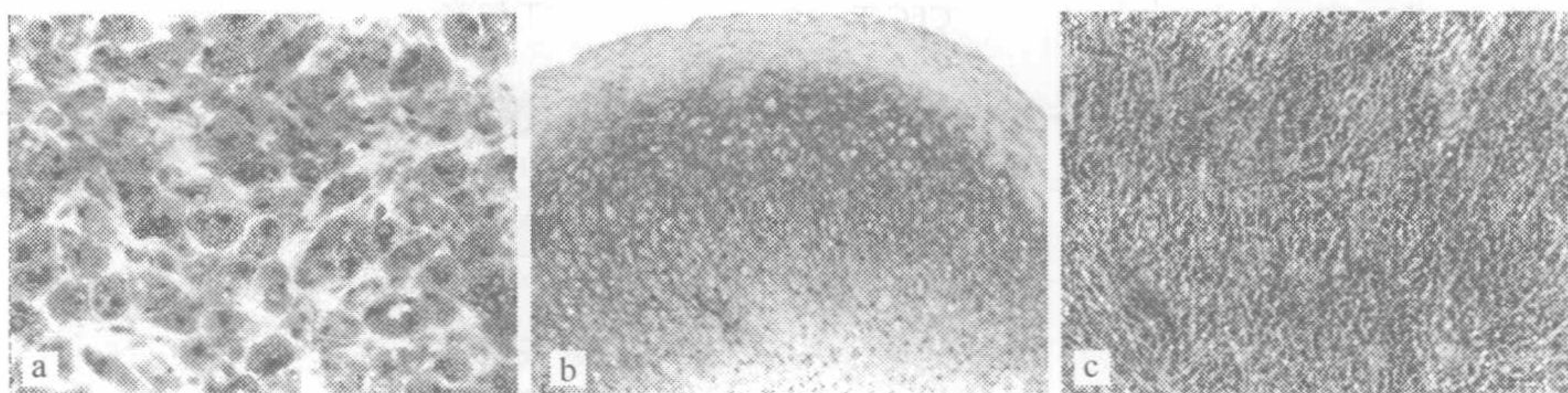


图 11-10　骨髓间充质干细胞分化形成骨、软骨和脂肪细胞（Pittenger，1999）

a. 脂肪细胞；b. 软骨细胞；c. 骨细胞。a 图可见脂肪细胞内橙红色脂滴（red oil O 染色）；b 图示软骨组织中Ⅱ型胶原蛋白（C4F6 单克隆抗体染色）；c 图示骨组织中碱性磷酸酶增加及钙沉积

（4）如果需从小鼠或者大鼠体内分离培养骨髓间充质干细胞，处理标本的方法如下：

①断颈处死动物，75％乙醇消毒 30min，分离股骨和胫骨，尽量去除骨上附着的软组织。

②剪去两端的骨骺端，暴露骨髓腔，用注射器吸取肝素/PBS 将骨髓冲出并收集，一定注意无菌操作。

③可以采用与上述方法相同的步骤，经细胞密度梯度分离（Ficoll）法分离单个核细胞后接种；也可以采用全骨髓接种法，即收集肝素/PBS 冲出的骨髓，1000r/min，5min 离心后直接接种。

（盖慧）

11.2.2　人造血干/祖细胞的体外培养与检测技术

造血干细胞（hematopoietic stem cell，HSC）是指存在于造血组织内的一类能分化发育成各种血细胞的原始细胞，具有高度的自我更新、扩增和多向分化能力。

在哺乳动物个体发育不同阶段，造血组织存在部位不同，如人胚第 6 周至第 5 个月，胎肝是主要的造血组织；胚胎第 4 个月开始，骨髓造血逐渐明显，而胎肝造血日趋

减少。出生后，造血干细胞主要存在于红骨髓内，约占骨髓有核细胞的 0.5%。另外在脾脏、淋巴组织和外周血中也有极少量的造血干细胞。近年来发现在人的脐带血中也含有比较丰富的造血干细胞。

在体内，造血干细胞通过不对称分裂维持造血组织中干细胞数量不变，通过发育分化成各种血细胞来维持整个机体血液系统的功能。图 11-11 是造血细胞发育的过程，HSC 先分化为多能髓性干细胞（pluripotential myeloid stem cell）和多能淋巴干细胞（pluripotential lymphoid stem cell）。前者再发育成粒细胞巨噬细胞系、红细胞系、巨核细胞系等造血祖细胞（hematopoietic progenitor cell，HPC），并进一步发育为白细胞、红细胞和血小板等；后者可进一步分化、发育成功能淋巴细胞，如 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞等。分化程度不同的细胞，表达不同分化产物，因此可利用细胞的特异标志来识别造血干/祖细胞。

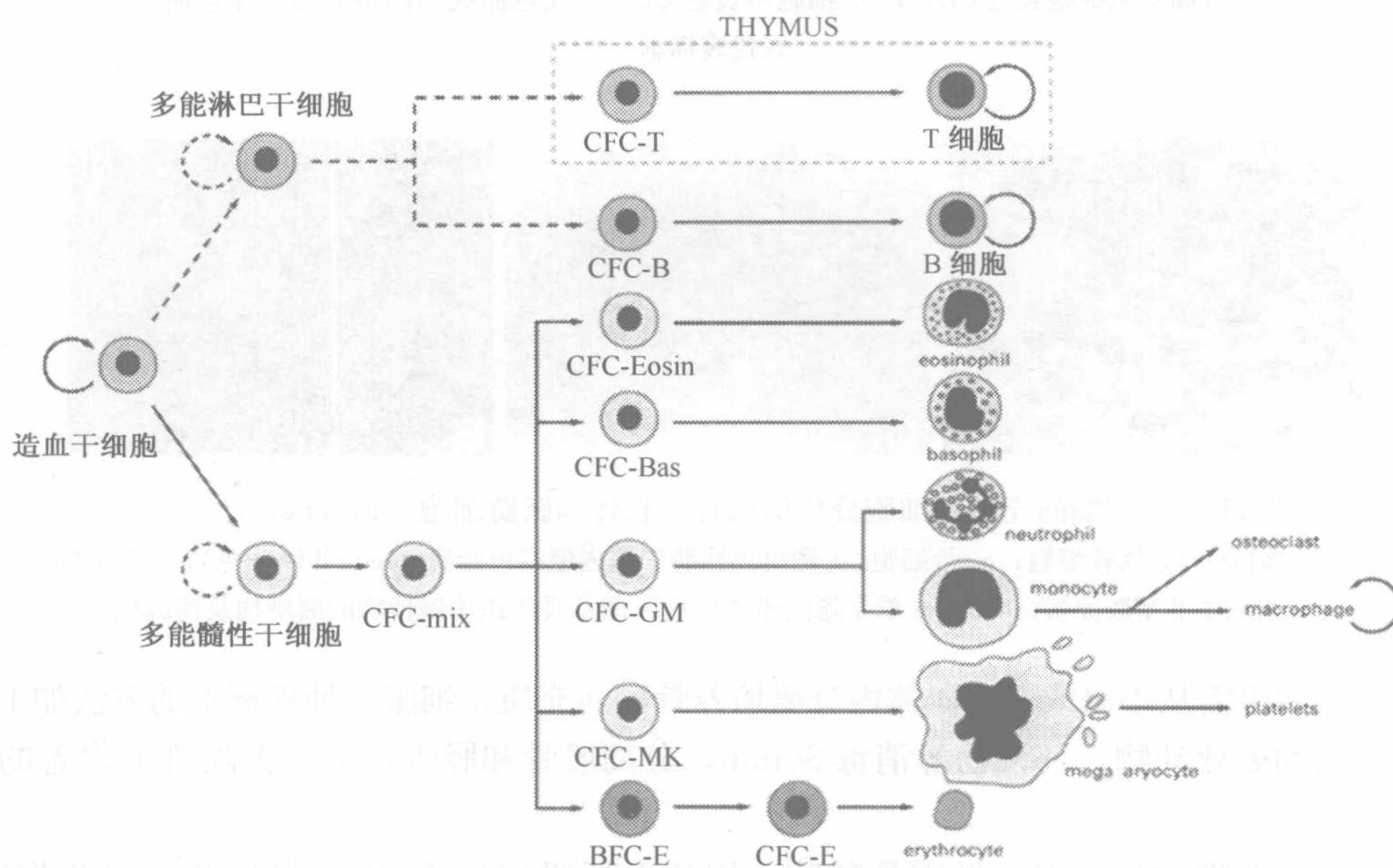


图 11-11　造血细胞发育的模式图

至今还未发现有关 HSC 的特异形态学特征，因此多利用其表面特异性抗原标志来进行鉴定和分离纯化。CD34 抗原是人们普遍认可的造血干/祖细胞的代表性表面标志，其表达量随细胞分化成熟逐渐减少甚至消失。$CD34^+$ 造血细胞是一组异质性细胞群体，直径3.4～6.7μm，其中其表达量 90%以上为造血祖细胞（HPC），极少为 HSC。目前普遍认为 HSC 的表型 $CD34^+$ $CD38^-$ Lin^- HLA^- DR^- $Thy\text{-}1^+$ $C\text{-}Kit^+$ $CFA\text{-}1^-$ $CD45RA^-$ $CD71^-$ Rhp^{dull} KDR^+ $CD133^+$。也有一些学者认为，$CD34^-$ HSC 可能比表达 $CD34^+$ HSC 更原始，且能生成 $CD34^+$ 细胞。

可以通过免疫磁珠吸附法以及流式细胞仪分选等方法将被抗体标记的 $CD34^+$ 细胞分离出来。另外，可以利用 99.5%以上的 HSC 细胞处于 G_0 静止期，不进行 DNA 合成，对活体染料拒染的特性对其进行富集纯化。例如，采用 Rh-123 或 DNA 结合染料 Hochest 33342 染色无荧光反应的特点来收集、纯化 HSC。

随着现代细胞生物学技术的发展，可以在体外模拟或部分模拟体内的造血过程；对造血干/祖细胞进行分离纯化、扩增和定向诱导分化；还可以根据需要对细胞的功能进行激活和基因改造，在细胞移植、免疫治疗、输血和基因治疗等领域具有广阔的应用前景。

本节以脐带造血干细胞为例介绍人造血干/祖细胞的体外分离、培养、分化与鉴定方法。

11.2.2.1 人脐血干细胞的分离、培养与鉴定

【实验原理】

人脐带血中含有丰富的造血干细胞。体外培养造血干细胞的基本原则是：创造适合HSC生存、增殖与分化的条件，并保持其子代细胞不会失散，而又不与其他细胞相混淆。本实验通过密度梯度离心方法从脐血中分离、收集单个核细胞（含有HSC细胞），再利用集落刺激因子使其中的HSC增殖，最后通过软琼脂半固体培养法检测HSC集落形成能力来鉴定HSC的含量和分化能力。

常用的细胞因子有：粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（granulocyte-macrophage-CSF，GM-CSF）、粒细胞集落刺激因子（granulocyte-CSF，G-CSF）、促红细胞生成素（erythropoietin，EPO）、血小板生成素（thrombopoietin，TPO）、白介素-3（interleukin-3，IL-3）和Flk-2/Flt-3配体（Flk-2/Flt-3 ligand，FL）等。

【实验用品】

1. 仪器与用品

超净工作台、离心机、CO_2培养箱、倒置荧光显微镜、立体显微镜等。无菌离心管、细胞培养瓶、35mm玻璃培养皿、刻度吸管、大烧杯、5cm × 5cm载玻片（用10%的多聚赖氨酸处理，自然干燥备用）等。

2. 试剂与配方

肝素、淋巴细胞分离液（密度1.077±0.001g/ml）、IMDM培养液、小牛血清、马血清及青-链霉素；EPO、TPO、IL-3、GM-CSF、G-CSF和SCF等细胞因子；谷氨酰胺、巯基乙醇、PBS液（pH 7.2）；琼脂、光学树脂、乙醇、二甲苯。

（1）3%戊二醛：用50%戊二醛6ml加PBS液94ml混合而成。

（2）5%琼脂：称取5g琼脂，置于100ml PBS（pH7.2）中，煮沸并搅拌使全部溶解，高压灭菌20min，放室温备用。使用前置70℃水浴箱中。

3. 材料

人脐带血。

【方法与步骤】

1. 脐带血采集

在距离新生儿脐部5～7cm处，用血管钳夹紧脐带，在两钳中间断脐，包扎处理新生儿脐带后，用粗针头穿刺较粗脐静脉，脐血随产妇子宫收缩直接流入无菌血袋中（肝素抗凝，终浓度25U/ml），轻轻摇匀，可采集大约50～120ml脐血。

2. 分离单个核细胞（mononuclear cell，MNC）

MNC包括淋巴细胞、造血干细胞、造血祖细胞和单核细胞，其相对密度为1.075～1.090之间。而红细胞和多形核细胞比重较大，为1.092左右。分离时先将分层液置试管底层，然后将抗凝脐血以PBS液作对倍稀释后，轻轻加在分层液上面，使两者形成一个清晰的界面。2500r/min水平式离心20min后，离心管中会出现几个不同层次的液体和细胞带。红细胞和粒细胞比重大于分层液沉于最底层，血小板则因密度小而悬浮于血浆中，唯有与分层液密度相当的单个核细胞密集在血浆层和分层液的界面中，呈白膜状，吸取该层细胞，使用PBS液（pH 7.2）在1200r/min离心8min洗涤细胞2次，用含10%小牛血清的IMDM培养液制成2×10^5个/ml的MNC悬液备用，全过程无菌操作。

3. 造血干细胞/祖细胞的扩增与鉴定

1）扩增培养液

（1）基质细胞培养液：IMDM培养基外加10%体积的小牛血清，内含青霉素（100U/ml)和链霉素（100μg/ml)。

（2）造血干/祖细胞扩增培养液：IMDM培养基外加10%体积的小牛血清，内含青霉素（100 U/ml）、链霉素（100 μg/ml）、10^{-4}mol/L二巯基乙醇、IL-3（25 ng/ml）、SCF（100 ng/ml）、IL-6（100 ng/ml）、FL（100 ng/ml）和TPO（10 ng/ml）。

2）培养方法

（1）细胞因子组合扩增法

每35mm培养皿中加入1×10^5个MNC，在造血干/祖细胞扩增培养液、37℃和5% CO_2条件下培养7天，细胞刮刀轻轻刮下底面所有细胞，IMDM培养液吹打刮刀和培养皿底面后收集所有细胞，计数，准备做免疫荧光染色和集落培养分析。

（2）基质细胞共培养方法

基质细胞系FBMD-1在基质细胞培养液中培养，置37℃和5% CO_2条件下，长至100%汇合后，换新鲜的基质细胞培养液，每35mm培养皿中加入1×10^5个MNC，37℃和5% CO_2条件下培养7天，无血清IMDM培养液洗涤2次，每皿加入0.1%胰蛋白酶1ml，置37℃消化5min，离心收集所有洗涤液和消化液中的未贴壁细胞，做计数、免疫荧光染色和集落培养分析。

3）免疫荧光染色鉴定

将细胞悬液滴加至用多聚赖氨酸预处理的载玻片上，风干后，置冷丙酮中固定10min。

用pH 7.2的PBS冲洗5 min×2次。

滴加含50ml/L胎牛血清的PBS封闭30min。

滴加FITC标记的羊抗人CD34抗体（按1∶250稀释）于固定细胞上，置湿盒中37℃作用1 h。

用PBS冲洗5 min×3次，荧光显微镜下观察。

4. HSC 的诱导分化与鉴定

鉴定造血干细胞/祖细胞的分化能力常用软琼脂半固体平板培养法

（1）软琼脂半固体培养基的准备：

①培养皿底层琼脂制备：

取 5%琼脂加热融化，略冷却后，浸于 45℃水浴中；将 IMDM 培养液也浸于 45℃水浴中。

将琼脂与培养液以 1∶4（*V/V*）混合，制成 1%琼脂培养液，浸于 45℃水浴中。

将此 1%琼脂培养液铺于 35mm 培养皿内，4℃凝固 10min，使成一薄层琼脂底层。

②培养皿上层培养体系的配制（见表 11-3～表 11-6）：每一培养体系所含成分以总体积为 10ml 为例。

表 11-3　粒、巨噬系祖细胞（CFU-GM）的培养体系

细胞悬液（2×10^5 个/ml）	0.5ml
马血清	3ml
GM-CSF	终浓度 1ng/ml
G-CSF	终浓度 100ng/ml
IL-3	终浓度 5ng/ml
SCF	终浓度 20ng/ml
IMDM 培养液	补足至 9.4ml

表 11-4　红系造血祖细胞（CFU-E、BFU-E）的培养体系

细胞悬液（2×10^5 个/ml）	0.5ml
10^{-4}mol/L 的巯基乙醇	0.3ml
3%谷氨酰胺	0.03ml
马血清	3ml
EPO	终浓度 2 U/ml
SCF	终浓度 100 ng/ml
IMDM 培养液	补足至 9.4ml

表 11-5　巨核造血祖细胞（CFU-MK）的培养体系

细胞悬液（2×10^5 个/ml）	0.5ml
3%谷氨酰胺	0.03ml
10^{-4}mol/L 的巯基乙醇	0.3ml
马血清	3ml
EPO	终浓度 2 U/ml
TPO	终浓度 10 ng/ml
IL-3	终浓度 10 ng/ml
SCF	终浓度 25 ng/ml
IMDM 培养液	补足至 9.4ml

表 11-6　混合细胞集落（CFU-GEMM、CFU-Mix）的培养体系

细胞悬液（2×10^5 个/ml）	0.5ml
3%谷氨酰胺	0.03ml
10^{-4}mol/L 的巯基乙醇	0.3ml
马血清	3ml
EPO	终浓度 2 U/ml
TPO	终浓度 10 ng/ml
IL-3	终浓度 5 ng/ml
GM-CSF	终浓度 1 ng/ml
SCF	终浓度 50 ng/ml
IMDM 培养液	补足至 9.4ml

（2）以上含有细胞的混合液在 37℃水浴中保温 10～20min。

（3）加入 45℃预热的 5%琼脂液 0.6ml 后，立即混匀（最好边加琼脂边振荡），在每个培养皿内加入培养物 1ml，并使之均匀铺平，加盖，流程见图 11-12a 和 b。

（4）送入 37℃、饱和湿度的 5%CO_2 培养箱中培养 7～12d，在放大 30～40 倍普通生物显微镜下计数细胞集落数，见图 11-12c。

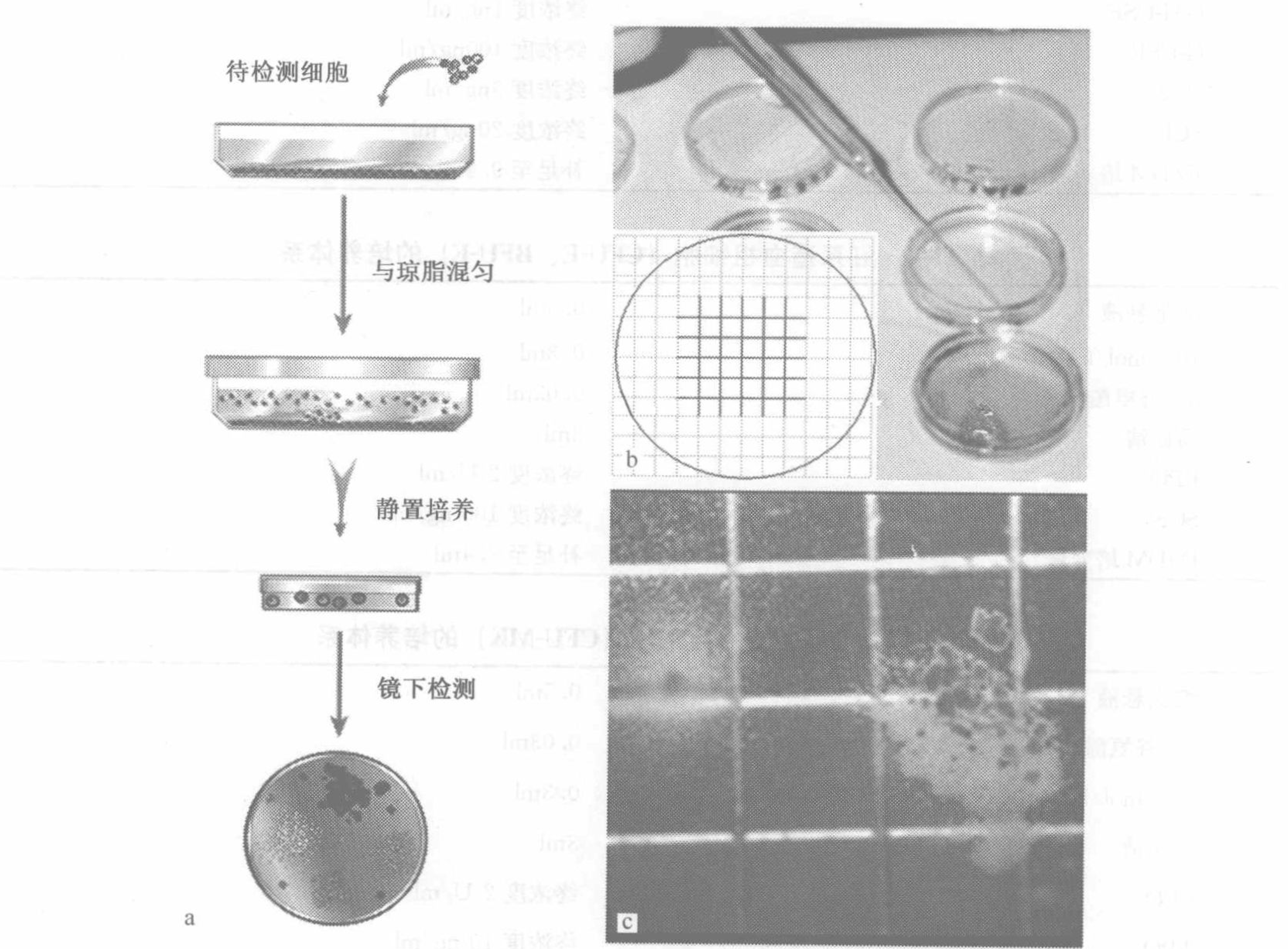


图 11-12　琼脂半固体培养法及细胞克隆计数

a. 集落培养操作步骤；b. 采用培养皿培养，皿底最好带有分划易于计数的方格；c. 镜下分格计数集落

5. 染色

为了获得集落的自然分布和细胞的形态变化结果，使之永久保存和研究，可将琼脂培养物制成原位片并进行染色，制作方法如下：

（1）在集落形成良好的琼脂培养皿内加入 1.5ml PBS 液。

（2）10min 后，用针轻轻拨动培养皿的上层琼脂，然后吸去琼脂上的溶液，再加 2ml 3%戊二醛溶液固定 10min。

（3）弃去琼脂上的戊二醛溶液，再加满蒸馏水，并将盛有蒸馏水的培养皿慢慢沉到大烧杯内的水中，可见琼脂膜慢慢漂浮于水中。

（4）用大玻片从琼脂膜下托起，将琼脂膜平展在大玻片上，用滤纸吸干过多的水分，将大玻片自然干燥，或放置在 60℃烘箱干燥，也可用吹风机吹干。

（5）晾干后立即用瑞氏染液染色。

（6）水洗后，分别经 70%、80%、90%到 100%乙醇脱水。

（7）浸泡在二甲苯中两次，各 3min，光学树脂和盖玻片封片，干燥后镜下观察。

【观察与结果】

1. 免疫荧光染色观察

首先在普通光镜下观察，计数一个视野内的细胞个数，然后切换到荧光下观察，计数绿色荧光阳性的细胞个数，计算 CD34 阳性细胞占总细胞中的比率，见图 11-13。

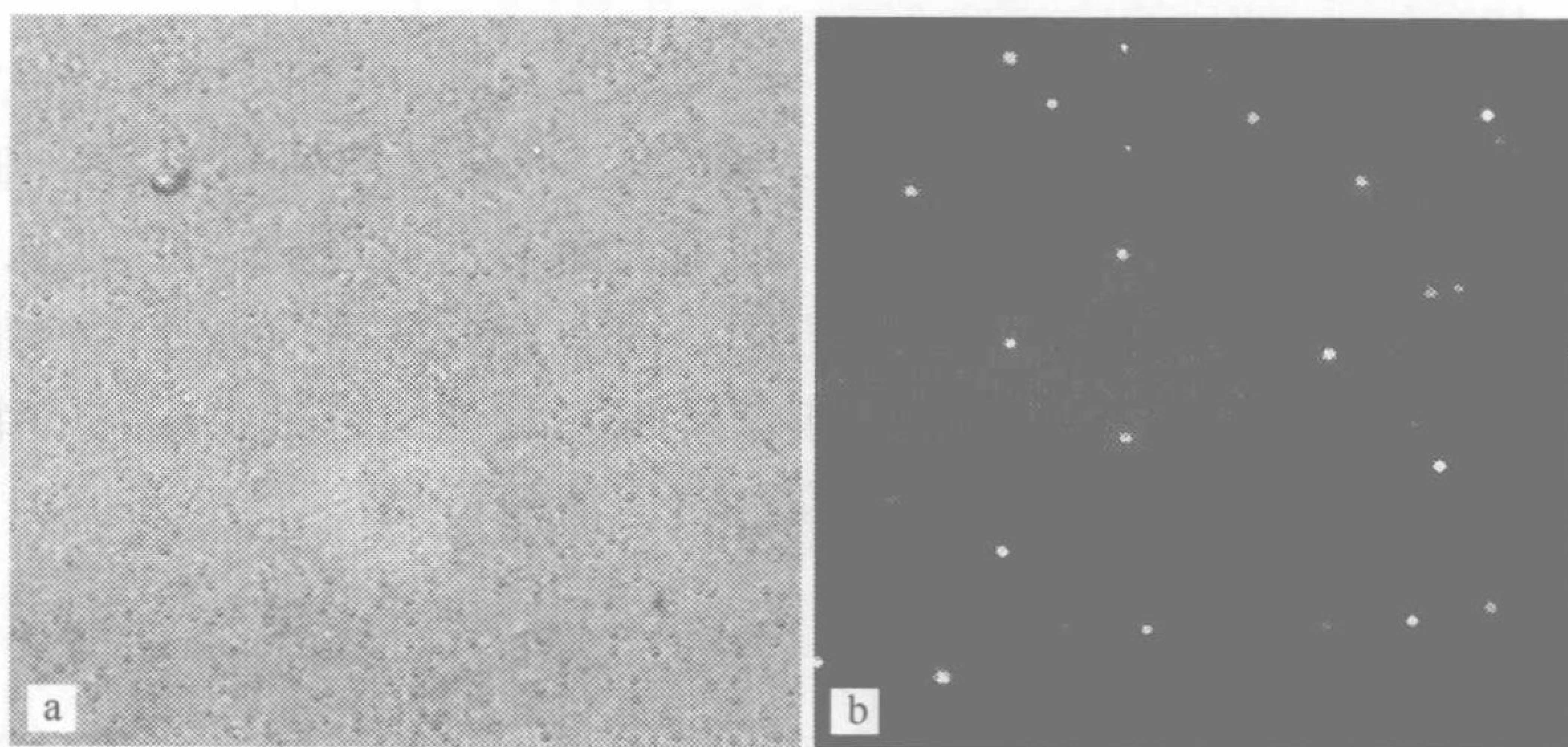


图 11-13　CD34 免疫荧光染色

a. 普通光镜观察（100×）；b. 同视野荧光观察（100×）

2. 平板培养细胞克隆的观察

将培养皿放置在立体显微镜下计数细胞集落数。凡是一个干/祖细胞增殖成一个克隆（clone），每个克隆增殖分化为一堆同源的细胞，超过 40 个以上细胞者为一个集落（colony），不足 40 个细胞者称为丛，超过 20 个细胞者为大丛，少于 20 个细胞大于 3 个细胞为小丛。为了获得准确的计数结果，必须顺序依次进行计数。

用粗准焦螺旋（不用细准焦螺旋）调节显微镜，容易观察到不同深度的细胞集落（图 11-14）。

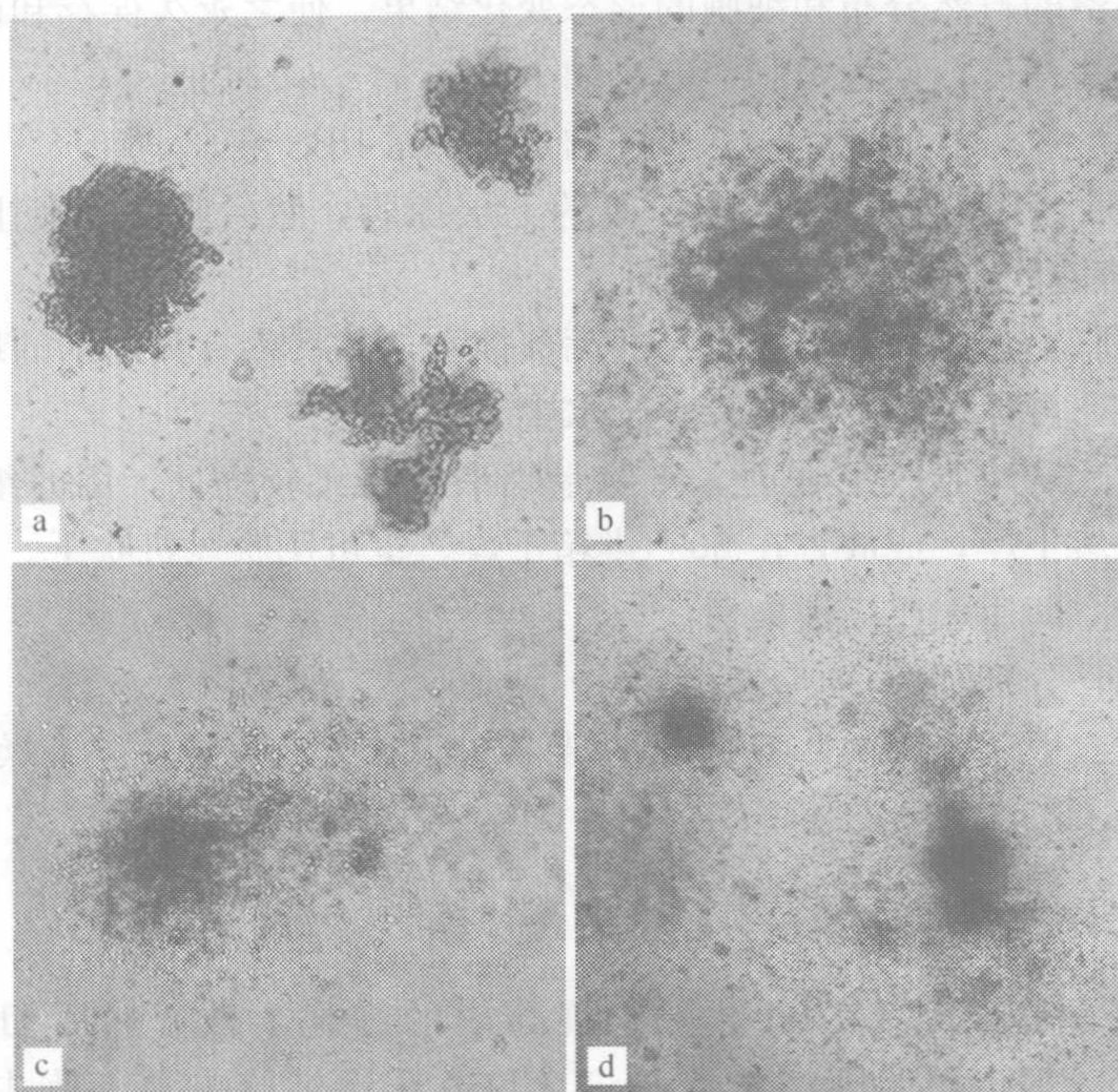


图 11-14　平板培养细胞克隆的观察
a. BFU-E 集落；b. CFU-GM 集落；c. CFU-MK 集落；d. CFU-GEMM 混合集落

（1）培养 CFU-GM 时可出现 2 种类型的集落。一种是粒细胞集落，细胞较小呈圆形，且聚集成堆。另一种是巨噬细胞集落，细胞大而形态不规整，且分散。

（2）红系集落形态特征与粒系集落的不同，前者背景稍暗，集落内细胞呈圆形，体积较小。由于细胞浆内有血红蛋白合成，集落呈现暗黄色。越是由成熟的细胞组成的集落，颜色越明显，呈橘红色，培养物在不染色时也清楚可见。

3. 细胞克隆原位片瑞氏染色观察

瑞氏染色的染料配方浓度对细胞核着色程度适中，细胞核结构和色泽清晰艳丽，对核结构的识别较佳，但对胞浆着色偏酸，色泽偏红。不同的血细胞染色效果见图 11-15。

【注意事项】

（1）由于 35mm 培养皿开口大，实验操作过程繁琐，集落培养时间长，为防止污染细菌及真菌，全部过程要严格无菌操作，另外在细胞培养液中需要加抗生素。

（2）在培养皿的四周，由于琼脂的吸附作用，琼脂厚度增加。由于折光关系，集落形态易于变性，计数集落时需要注意。

（3）细胞因子组合法扩增造血干/祖细胞时，可尽量采用玻璃培养皿，避免血细胞在塑料培养皿上过多黏附。

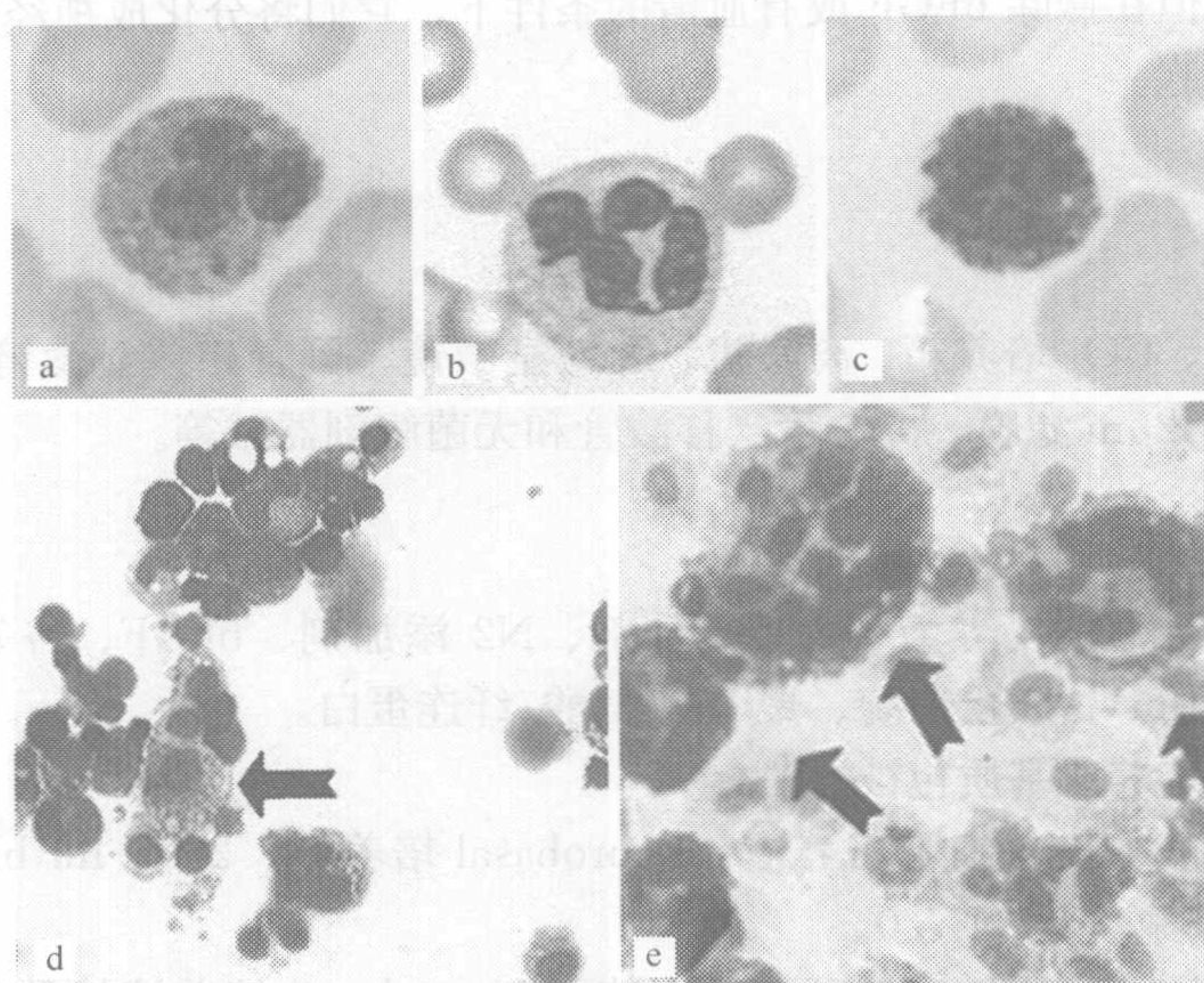


图 11-15　细胞克隆原位片瑞氏染色观察

a. 嗜酸性粒细胞；b. 嗜中性粒细胞；c. 嗜碱性粒细胞；d. CFU-GM 混合集落中粒细胞与巨噬细胞混合，箭头所指为巨噬细胞；e. CFU-MK 集落，箭头所指为巨核细胞

（李栋）

11.2.3　大鼠胚胎脑神经干细胞和祖细胞的分离培养

神经干细胞（neural stem cell，NSC）是一类起源于神经外胚层的未分化的多能干细胞（multipotent）。它们具有自我更新和分化成神经系统各类细胞的能力。神经祖细胞（neural progenitor）具有有限的自我更新能力，最终将分化成特定种类的神经细胞。神经干细胞大量存在于神经系统发生的早期，在神经管刚刚闭合的时候，神经干细胞开始分化成祖细胞，造成神经干细胞和祖细胞在胚胎脑内混合共存现象的发生。由于神经干细胞没有特异的标志物（marker），很难把它们和神经祖细胞区别开来。

大量研究表明，发育和成熟的神经系统内均存在着神经干细胞，如胚胎脑的纹状体、海马、皮层脑室等多个部位都含有大量神经干细胞，而在成年哺乳动物脑内的海马齿状回颗粒下层、侧脑室的室管膜下区、大脑皮层、小脑和脊髓等部位也同样可以分离出神经干细胞。不同来源的神经干细胞的培养和扩增方法大致相同，本节以大鼠胚胎脑神经干细胞为例介绍神经干细胞的分离、培养和扩增方法。

【实验原理】

大鼠胚胎在发育到第 13 天时（E13），端脑刚刚形成，它的神经上皮细胞（neuroepithelial cell）代表最早的一批多能神经干细胞和祖细胞。本节将介绍我们从 E13 大鼠端脑分离、培养神经干细胞和祖细胞的方法。神经干细胞体外培养有两种方法：即神经球（neurosphere）悬浮法和贴壁法（adherent）。在碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF）的刺激下，神经干细胞和祖细胞可以不断增殖，并保

持不分化状态，但在撤除 bFGF 或有血清的条件下，它们将分化成神经元，星形胶质细胞和少突胶质细胞。

【实验用品】

1. 实验器材

超净工作台、CO_2 培养箱、离心机、解剖显微镜、倒置相差显微镜、荧光显微镜、细菌培养皿、0.22μm 滤膜、离心管、移液管和无菌解剖器械等。

2. 试剂

Neurobasal 无血清培养液、B27 添加剂、N2 添加剂、bFGF、谷氨酰胺、木瓜蛋白酶（Worthington）、胰蛋白酶、聚 D-赖氨酸/纤连蛋白。

液体配方及培养皿基质包被方法：

（1）神经干（上皮）细胞培养液：Neurobasal 培养液、20ng/ml bFGF、2% B27、0.5mmol/L 谷氨酰胺、pH 7.0。

（2）神经干（上皮）细胞接种液：在使用 Neurobasal 培养液接种时，除上述试剂外，需要再加入 25μmol/L 谷氨酸。

（3）DMEM / F12 培养液：DMEM / F12、20ng/ml bFGF、2% B27、0.5mmol/L 谷氨酰胺、1mg/ml BSA、pH 7.0（可以替代 Neurobasal 培养液）。

（4）配制木瓜蛋白酶分解溶液：将 20 单位的木瓜蛋白酶（Worthington）溶解在含有 0.5mg/ml DNase Ⅰ 的 1ml PBS 内。20 个胚胎端脑大约需要 3ml 木瓜蛋白酶分解溶液。

（5）培养皿基质包被：

① 用蒸馏水稀释聚 D-赖氨酸至终浓度为 20μg/ml。在 37℃下用此包被 100mm 培养皿 5h。吸出多余的聚 D-赖氨酸，用蒸馏水清洗后，干燥备用。

② 用蒸馏水稀释纤连蛋白至终浓度为 20μg/ml。在 37℃下用此包被已浸过聚 D-赖氨酸的培养皿 5h。吸出多余的纤连蛋白，用蒸馏水清洗后，干燥。

（6）0.125%胰蛋白酶：将 0.125mg 的胰蛋白酶溶解在 100ml 无钙镁 Hank's 溶液中，完全溶解后经 0.22μm 无菌滤膜过滤备用。

3. 实验材料

孕 13 天大鼠。

【方法与步骤】

1. 分离神经干细胞

（1）用颈椎脱臼法处死孕 13 天大鼠。

（2）剪开腹部，暴露子宫，取出子宫置于盛有 4℃ PBS 的 100mm 培养皿内。

（3）在解剖显微镜下，剪开子宫，温和地压迫肌壁，取出胚胎，断头。

（4）在解剖显微镜下，暴露整个脑，用细镊子将正在形成的背侧端脑（图 11-16）取出，放入 4℃培养液。

（5）将端脑组织用细镊子研碎，放入盛有 5ml 4℃神经干细胞培养液的 15ml 锥形离心管内，1000r/min 下离心 8min，去除上清液。

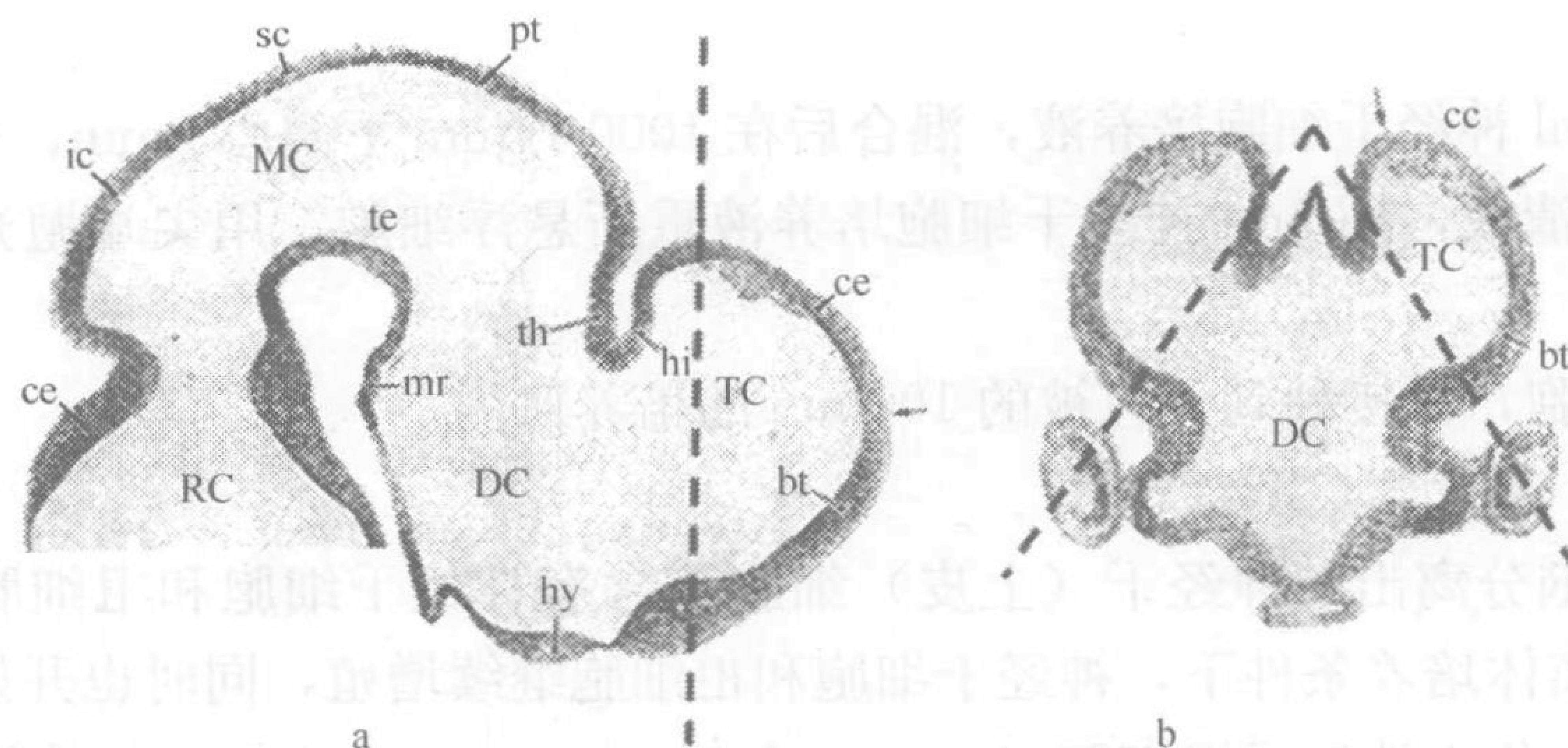


图 11-16　显微解剖大鼠胚胎端脑示意图

E13 大鼠胚胎端脑的矢状切面（a）和冠状切面（b），虚线表示刀切口

（6）加入含有 60 单位的木瓜蛋白酶溶液和 0.5mg/ml DNAseI 的分解液（大约 3ml）。用 5ml 吸管轻轻吹打将组织和酶分解液混匀。在 37℃下孵育 30min。

（7）加入 5ml 神经干细胞培养液以终止木瓜蛋白分解酶。用 5ml 吸管温和吹打 5 次，在转速 1000r/min 下离心 5min。

（8）去除上清液，加入 3ml 神经干细胞培养液，用尖端抛光的巴斯德吸管吹打 5 次，使之形成单细胞悬液。

（9）细胞计数后接种。

2. 神经干细胞贴壁培养法

（1）使用接种培养液，将细胞接种到已经包被聚 D-赖氨酸/纤连蛋白的 100mm 培养皿上。接种细胞密度为 5×10^4～10×10^4 个/ml 细胞。放在 37℃，5% CO_2 条件下培养。细胞将在 3～5h 内贴壁。

（2）第二天，更换普通神经干细胞培养液。以后，每 2～3 天更换一半培养液，并补加相应的生长因子。

（3）传代：

① 在 bFGF 刺激下，神经干细胞迅速增殖，应每 3 天传代一次。

② 当细胞 80%铺满时，去除培养液，加入 2ml 0.125%胰蛋白酶溶液，在 37℃孵育 2～5min。

③ 加入 5ml 神经干细胞培养液，吸管吹打收集细胞，在 1000r/min 转速下离心 5min，去上清液，加入 3ml 神经干细胞培养液使细胞重新悬浮，计数。

④ 接种在聚 D-赖氨酸/纤连蛋白包被过的培养皿上。

3. 神经干细胞克隆球悬浮培养法

（1）使用接种培养液，将木瓜蛋白酶分解的细胞接种到无包被的 100mm 培养皿内。接种细胞密度为 5×10^4～10×10^4/ml 个细胞。在 37℃，5%CO_2下培养。第二天更换普通神经干细胞培养液。

（2）传代：

① 将神经球和培养液转移到 15ml 离心管，在 1000r/min 转速下，离心 5min。

②去除上清液，加入 2ml 0.125%胰蛋白酶，混合，在 37℃水溶液中孵育 10～

20 min。

③ 加入 5ml 神经干细胞培养液，混合后在 1000 r/min 下离心 5min，重复洗 2 次。

④ 去除上清液，用 5ml 神经干细胞培养液重新悬浮细胞，用尖端抛光的巴斯德吸管吹打 10 次。

⑤ 计数细胞，再接种到无包被的 100mm 的培养皿内。

【观察与结果】

从 E13 端脑分离出的神经干（上皮）细胞包含有神经干细胞和祖细胞。在用神经干细胞培养液离体培养条件下，神经干细胞和祖细胞继续增殖，同时也开始分化。神经干细胞可继续分化为神经元祖细胞（neuronal restrictedprogenitor）和神经胶质性祖细胞（glial retricted progenitor）。用神经干细胞培养液培养一周左右，去除 bFGF，祖细胞会进一步分化为神经元，星型胶质细胞和少突胶质细胞。使用合适的抗体和免疫细胞化学方法，可以在一定程度上把这几类细胞区分开来。

(1) 抗 Nestin：标记神经干细胞和祖细胞。

(2) 抗 A_2B_5：标记神经元祖细胞和神经胶质性祖细胞。

(3) 抗 O_4：标记分化中的少突胶质细胞。

(4) 抗 β-Tubulin（TuJ1）：标记刚分化的神经元。

(5) 抗 GFAP：标记分化的星型胶质细胞（图 11-17）。

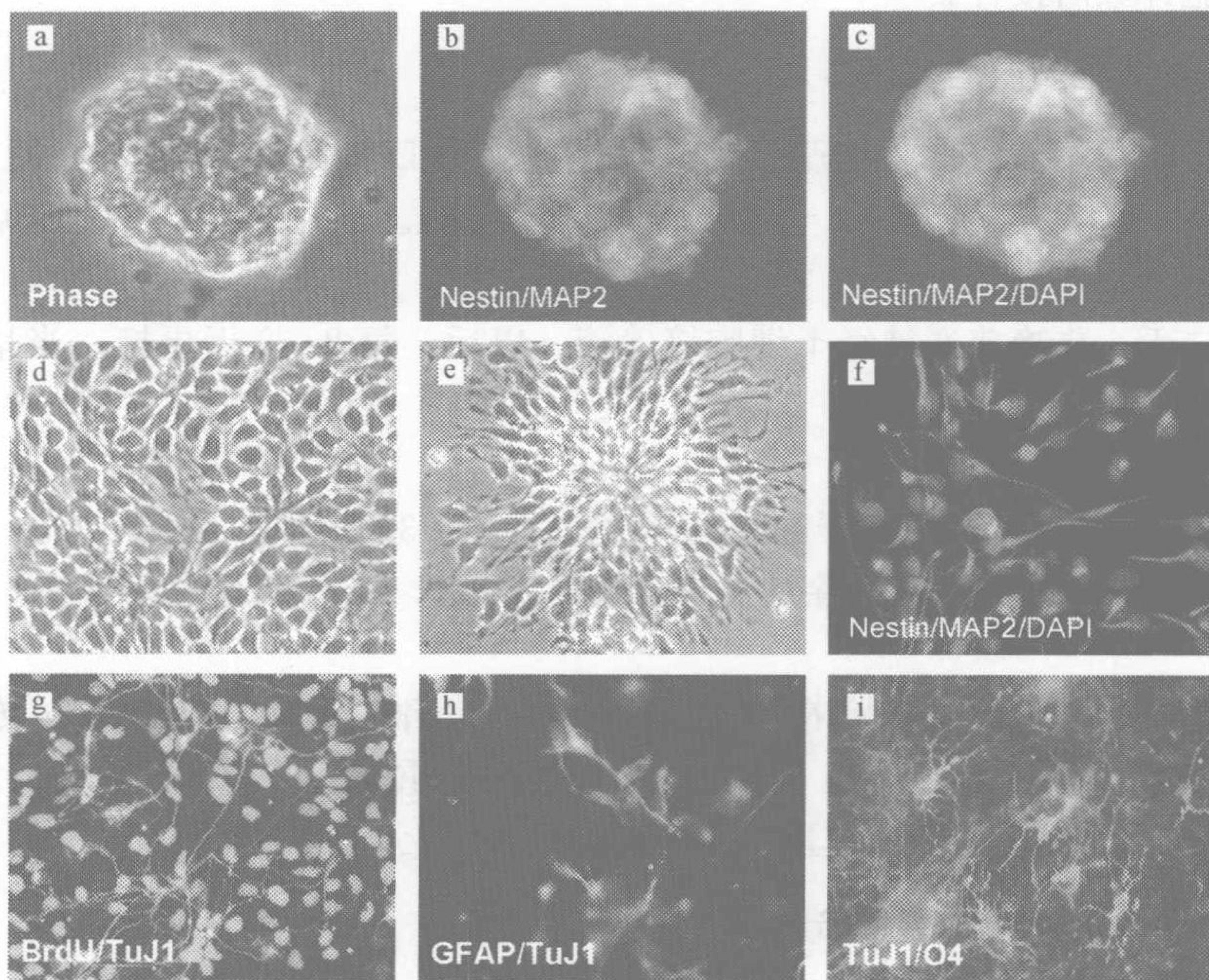


图 11-17 大鼠胚胎脑神经干细胞和祖细胞的分离培养

a～c. 用悬浮法体外培养的神经干细胞克隆球，该神经干细胞克隆球显示 Nestin 阳性的神经干细胞和祖细胞（红色），以及 MAP2 阳性的神经元（绿色）(b)，(c) 为将 DAPI 复染的细胞核叠加进图 (b) 后的效果图；d～i. 显示用贴壁法体外培养的神经干细胞，E13 端脑分离出的神经上皮细胞在 Poly-D-Lysine/Fibronectin 上培养 5 天 (d)，其中有的细胞扩展成集落样（Colony-like）结构 (e)，大多数细胞显示 nestin 阳性 (f)，一周后出现 TuJ1 阳性的神经元 (g)，接着出现 GFAP 阳性的星型胶质细胞 (h) 和 O_4 阳性的少突胶质细胞 (i)

【注意事项】

（1）如果选用小鼠（mouse）分离端脑神经上皮细胞，应该用孕11.5～12天小鼠。

（2）在分离神经上皮细胞时，木瓜蛋白酶和DNAseⅠ作用的时间和用巴斯德吸管吹打的次数要严格控制。过强过长的酶作用和机械吹打将会导致细胞死亡。

（3）在用吸管吹打时，要避免泡沫形成。过多泡沫会增加污染率，降低细胞生存率。

（4）适当加大接种密度会增加细胞分裂繁殖，减少细胞分化机会。

（马午　辛华）

11.3　神经组织工程

【实验原理】

组织工程是一种综合细胞、生物材料支架和生物化学信号因子等技术，形成组织器官替代物的新技术。组织工程化的组织器官替代物不仅可以用于修补和替代疾病的或损伤的组织器官功能，而且可以用于筛选药物，药物基因组分析以及检测环境中的化学和生物毒物。

组织工程技术将活细胞移植在具有生物相容性和生物降解性的三维支架里。支架材料具有一定的机械强度，并可以和细胞膜上整联蛋白（integrin）相互作用，引导植入细胞的贴壁、增殖和分化，形成具有特殊功能的三维组织。常用作为支架的生物材料有水凝胶、生物陶瓷以及以胶原蛋白为主的生物复合材料等。特别是天然的和人工合成的水凝胶已经广泛用于组织工程。我们将在本章介绍用一种天然水凝胶——Ⅰ型胶原蛋白（type Ⅰ collagen）作为支架材料促进神经干细胞生长和分化的方法。

组织工程的种子细胞可以是分化的和未分化的各类细胞。由于干细胞可以在体外长期培养并保持稳定的正常的基因表达，以及它们分化为各类细胞的巨大潜力，胚胎干细胞和组织特异干细胞（造血干细胞、骨髓基质干细胞、神经干细胞和皮肤干细胞等）已被广泛用于组织工程研究之中。在胚胎发育过程中，生长因子和细胞因子调节细胞的增殖和分化。这些生物化学因子同样在组织工程中起着关键性作用。比如，成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，FGF）和表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）具有多重生物活性，被广泛地用于促进细胞增殖和组织器官形成。目前，应用组织工程方法已经生产出人工骨、软骨、皮肤、肌腱、血管、神经等，其中在神经方面的应用具有最广泛的前景。本实验介绍将原代神经干细胞和祖细胞种植在Ⅰ型胶原蛋白支架中，用含有成纤维细胞生长因子的培养液，在2～3周内生产出包括神经元和神经胶质细胞的三维类神经组织。在这个组织工程化的类神经组织里，神经元形成有突触功能的神经网路。

【实验用品】

1. 仪器与用品

空气层析室、CO_2培养箱、离心机、解剖显微镜、倒置相差显微镜和荧光显微镜、无菌解剖用具、24孔培养板、35mm培养皿、100mm培养皿、0.22μm滤膜、离心管、移液管、冻存管。

2. 试剂与配方

1）神经干（神经上皮）细胞培养液

（1）Neurobasal 培养液：加入以下试剂到 Neurobasal 培养液内：

1×B27

0.5mmol/L 谷氨酰胺

20 ng/ml bFGF

（2）DMEM/F12 培养液：加入以下试剂到 DMEM/F12 培养液内：

1×N_2添加剂

1×B27

1mg/ml 牛血清白蛋白（BSA）

20ng/ml bFGF

2）Ⅰ型胶原蛋白（取自大鼠尾肌腱）

3）乙酸（acetic acid，pH3.0～4.0）

4）1mol/L NaOH

5）配制木瓜蛋白酶（papain）分解溶液

将 20 单位的木瓜蛋白酶（PAP2，Worthington Biochemical，Lakewood，NJ）溶解在含有 0.5mg/ml DNase Ⅰ 的 1ml PBS 内。20 个胚胎端脑大约需要 3ml 木瓜蛋白酶分解溶液。

3. 实验材料

孕 13 天大鼠。

【方法与步骤】

1. 制备Ⅰ型胶原蛋白溶液

（1）将Ⅰ型胶原蛋白溶解在 0.2%（*V/V*）乙酸，最终浓度为 3mg/ml。在 4℃下完全溶解需要 12～24h（图 11-18）。

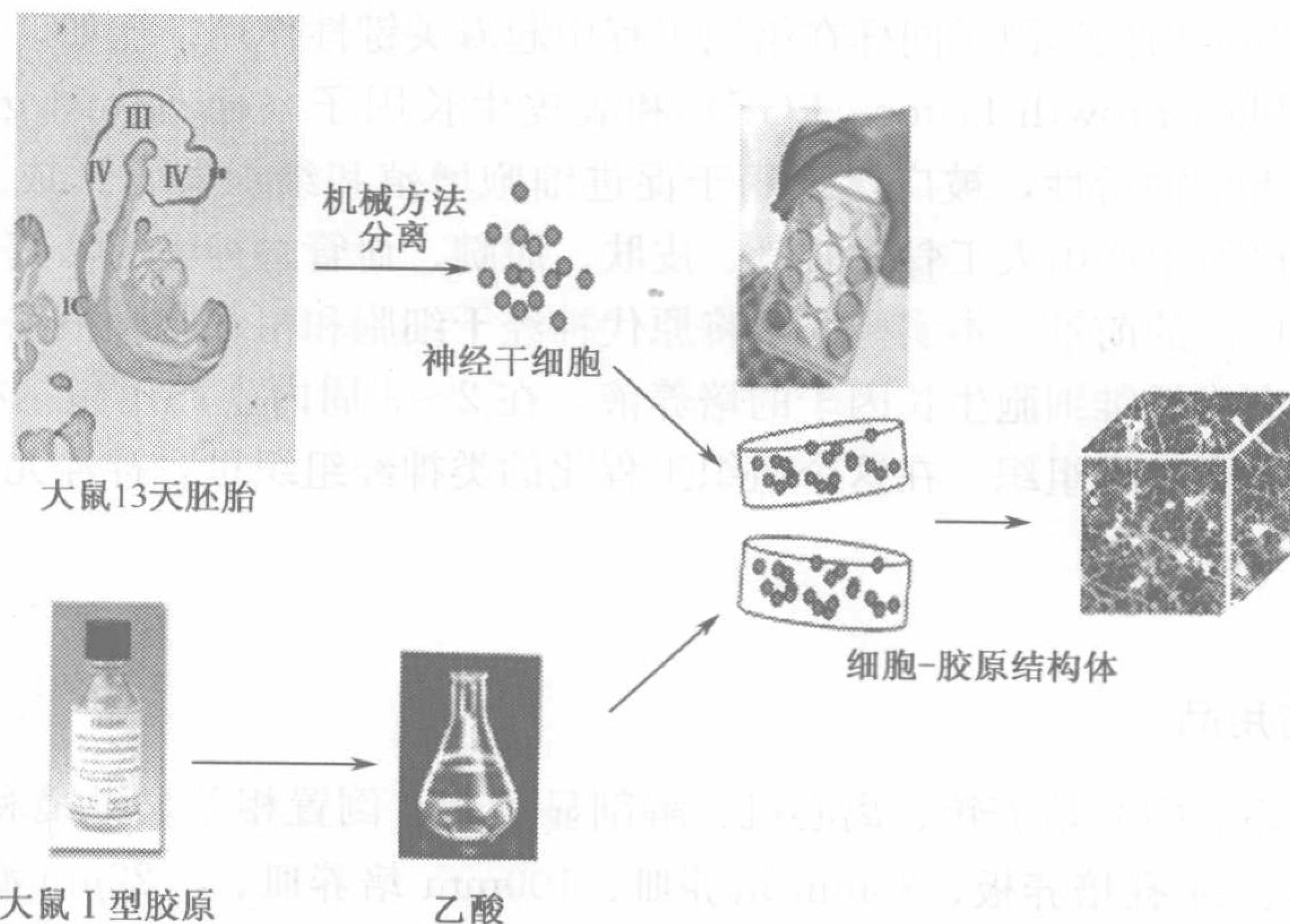


图 11-18　将原代神经干细胞和祖细胞种植在Ⅰ型胶原蛋白支架中的示意图

（2）溶解的胶原蛋白和 2×PBS 等体积混合，最终浓度是 0.5mg/ml。

（3）加入适量 1mol/L NaOH，调整 pH 至 7.4。

所有以上步骤应在冰上进行，操作温和，否则会影响胶体形成。

2. 神经干细胞和祖细胞的神经细胞分离

（1）颈椎脱臼处死孕 13 天大鼠。

（2）剪开腹部，暴露子宫。取出子宫置于盛有 4℃PBS 的 100mm 培养皿内；

（3）在解剖显微镜下，剪开子宫，温和地压迫肌壁，取出胚胎，断头；

（4）在解剖显微镜下，暴露整个脑，用细镊子将正在形成的背侧端脑取出，放入 4℃神经干培养液；

（5）将端脑组织用细镊子研碎，放入盛有 5ml 4℃神经干培养液的 15ml 锥形离心管内，沉淀，去除上清液；

（6）加入含有 60U 的木瓜蛋白酶溶液和 0.5mg/ml DNAse Ⅰ分解液（大约 3ml）。用 5ml 吸管轻轻吹打将组织和酶分解液混匀。在 37℃下孵育 30min；

（7）加入 5ml 神经上皮培养液中和木瓜蛋白分解酶。用 5ml 吸管温和吹打 5 次，在转速 1000 r/min 下离心 5min；

（8）去除上清液，加入 3ml 神经干培养液，用尖端抛光的巴斯德吸管吹打 5 次，使之形成单细胞悬液；

（9）细胞计数后，传代接种。

3. 将神经干细胞和祖细胞种植（immobilization）在胶原蛋白的支架内

（1）将神经干细胞和祖细胞悬液与胶原蛋白溶液混合，至细胞浓度为 2×10^5 个/ml。混合液注入 24 孔培养板，每孔 0.5ml，在 37℃，5% CO_2 下孵育；

（2）孵育 2h 后，胶原蛋白将在 37℃下形成胶体。加入 2ml 神经干细胞培养液。每 2～3 天，更换一半新鲜神经干细胞培养液。

（3）孵育两周左右，胶原蛋白支架间充满神经干细胞、祖细胞以及分化的神经元和神经胶质细胞。

【观察与结果】

原代神经干细胞和祖细胞种植在Ⅰ型胶原蛋白支架后，在含有成纤维细胞生长因子的培养液中迅速增殖（图 11-19），并且首先分化成神经元，然后分化成神经胶质细胞

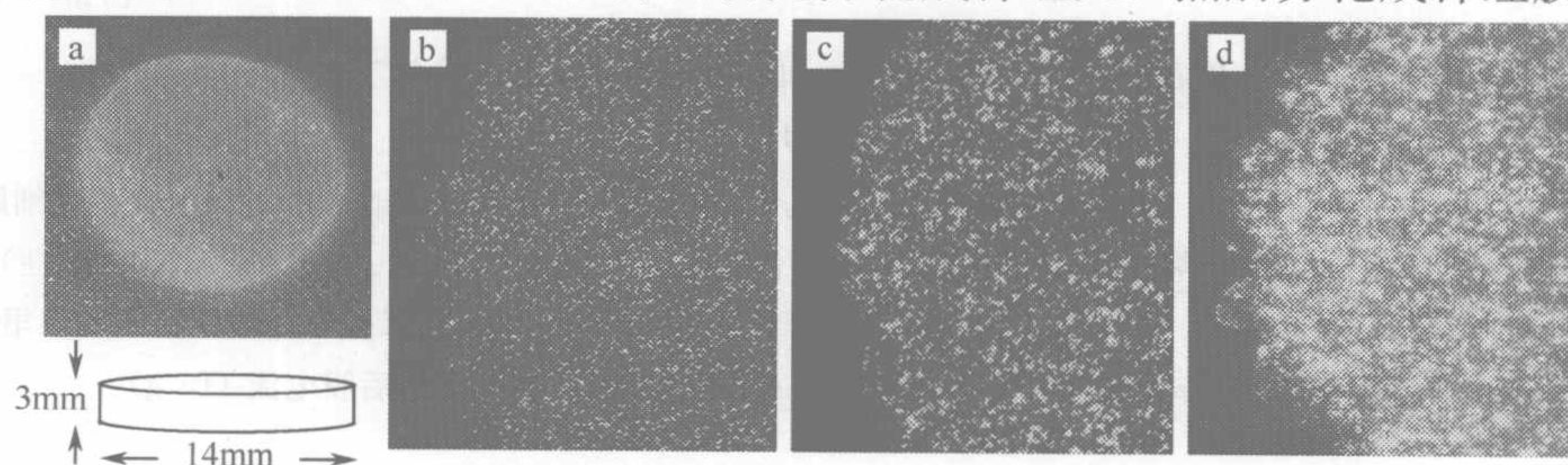


图 11-19　生长在胶原蛋白支架里的神经干细胞和祖细胞迅速增殖

a. 是在 24 孔培养板形成的细胞-胶原结构体；b～d. 神经干细胞和祖细胞在胶原蛋白支架里迅速增殖 1 天（b）、4 天（c）和 14 天（d）。使用 Live/Dead 荧光染色试剂鉴定细胞成活率，试剂中含有的 calcein AM 仅仅将活细胞染绿色荧光

和少突胶质细胞。大约在两周后形成有突触功能的神经网路。一般可以在 2～3 周内生产出包括神经元和神经胶质细胞的三维类神经组织。

1. 三维胶原蛋白支架中培养的细胞学鉴定

1）细胞增殖鉴定

(1) BrdU 掺入定量分析。

(2) 用 Live/Dead 荧光染色试剂（molecular probe，Eugene，OR）计算活细胞数目。此试剂中含有的 calcein AM 仅将活细胞染绿色荧光。

2）免疫细胞化学方法鉴定

用免疫细胞化学方法鉴定神经干细胞和祖细胞在三维胶原蛋白支架中分化的步骤：

(1) 先用 4% 甲醛将细胞-胶原蛋白支架固定。

(2) 用免疫细胞化学方法标记神经干细胞和祖细胞（nestin 阳性）、刚分化的神经元（TuJ1 阳性）、星型胶质细胞（GFAP 阳性）和分化中的少突胶质细胞（O_4 阳性）（图 11-20a、b、c、d）。

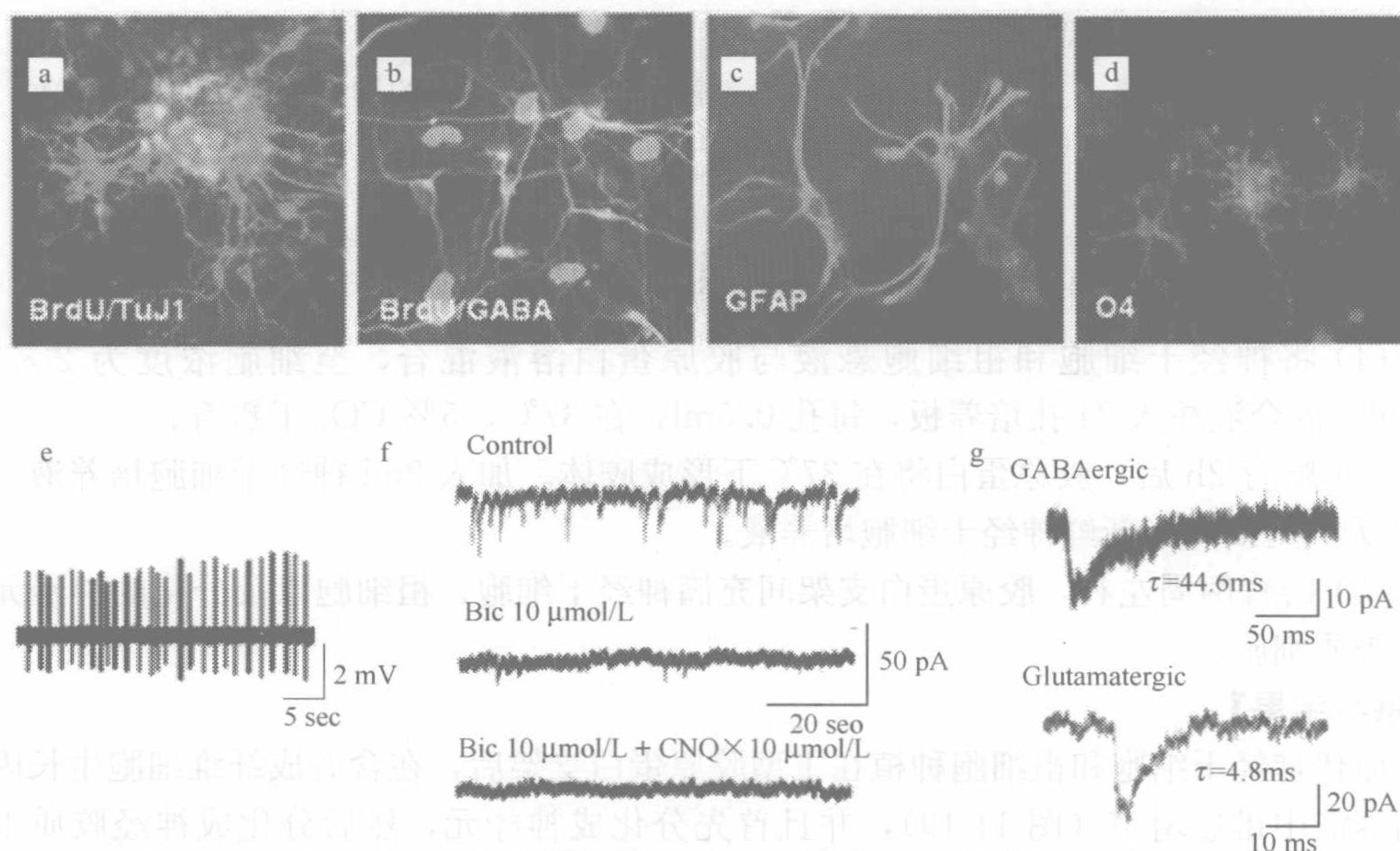


图 11-20 生长在胶原蛋白支架里的神经干细胞和分化成的三种神经细胞，并形成有突触功能的神经网路

生长在胶原蛋白支架里的神经干细胞和祖细胞分化成神经元（a，b），星型胶质细胞（c）和少突胶质细胞（d），并且形成有突触功能的神经网路（e～g）。使用免疫细胞化学方法鉴定神经元（TuJ1 阳性，GABA 阳性），星型胶质细胞（GFAP 阳性）和分化中的少突胶质细胞（O_4 阳性）。用膜片钳技术记录生长在胶原蛋白支架里的神经网路，显示神经动作电位（e），GABAergic 和 glutamatergic 突触后膜电流（f，g）

3）神经网路里突触功能的鉴定

神经网路用膜片钳技术记录生长在胶原蛋白支架里的神经网路，神经细胞在胶原蛋白支架里培养两周后显示动作电位，然后 GABAergic 和 Glutamatergic 突触后膜电流接着产生（图 11-20e、f、g）。

【注意事项】

（1）在制备Ⅰ型胶原蛋白溶液和将神经干细胞和祖细胞胶原蛋白溶液种植在胶原蛋白的支架内时，动作要温和，胶原蛋白溶液和细胞胶原溶液应放在冰上，强烈振荡会妨碍胶体形成。

（2）神经干细胞和祖细胞的增殖对酸碱度很敏感。将Ⅰ型胶原蛋白溶解在乙酸后，必须加入适量 NaOH 将 pH 调整至7.4。

（马午）

参考文献

辛华，魏东光，王茜等. 2001. 胚胎大鼠中枢神经系统神经干细胞分离培养与观察. 山东医科大学学报，39(3)：197～200

Amit M, Itskovitz-Eldor J. 2006. Derivation and maintenance of human embryonic stem cells. Methods Mol Biol, 331: 43～53

Bianco P, Riminucci M, Kuznetsov S et al. 1999. Multipotential cells in the bone marrow stroma: regulation in the context of organ physiology. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 9: 159～173

Bradley A, Evans M, Kaufman M H. 1984. Robertson E. Formation of germ-line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. Nature, 309: 255～256

Breems D A, Blokland E A, Siebel K E et al. 1998. Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during ex vivo expansion of $CD34^+$ mobilized peripheral blood stem cells. Blood, 91(1): 111～117

Carpenter M K, Inokuma M S, Denham J et al. 2001. Enrichment of neurons and neural precursons from human embryonic stem cells, Exp. Neurol. 172: 383～397

Charrier S, Michaud A, Badaoui S et al. 2004. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme induces radioprotection by preserving murine hematopoietic short-term reconstituting cells. Blood, 104(4): 978～985

Desbaillets I, Ziegler U, groscurth P et al. 2000. Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. Exp Physiol, 85: 645～651

DiGirolamo cm, Stokes D, Colter D et al. 1999. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. Br J Haematol, 107: 275～281

Doetschman T C, Eistetter H, Katz M et al. 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J Embryol Exp Morphol, 87: 27～45

Evans M J, Kaufman M H. 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. Nature, 292: 154～156

Gottlied D I, Huettner J E. 1999. An *in vitro* pathway from ESCs to neurons and glia. Cells, Tissues Organs, 165: 165～172

Gronthos S, Simmons P J. 1996. The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. J Hematother, 5: 15～23

Haynesworth S E, Baber M A, Caplan A I. 1992. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. Bone, 13: 69～80

Heo K, Jariwala U, Woo J et al. 2006. Involvement of Niemann-Pick type C2 protein in hematopoiesis regulation. Stem Cells, 24(6): 1549～1555

IvanovičZ, Bartolozzi B, Bernabei P A et al. 1999. A simple, one-step clonal assay allows the sequential detection of committed (CFU-GM-like) progenitors and several subsets of primitive (HPP-CFC) murine progenitors. Stem Cells, 17(4): 219～225

Jaiswal N, Haynesworth S E, Caplan A I et al. 1997. Osteogenic differentiation of purified, cultureexpanded human mes-

enchymal stem cells *in vitro*. J Cell Biochem, 64: 295～312

Kawase E. Duemon H. 1994. Strain difference in establish mESC lines. Lnt J Dev Bio, l38: 385～390

Kuznetsov S A, Friedenstein A J, Robey P G. 1997. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. Br J Haematol, 97: 561～570

Laywell E D, Kukekov V G, Suslov O. 2002. Production and analysis of neurospheres from acutely dissociated and postmortem CNS specimens. Methods Mol Biol, 198: 15～27

Lin J H, O'Shaughnessy T J, Kelly J et al. 2004. Neural stem and progenitor cell differentiation in a cell-collagen-bioreactors culture system. Developmental Brain Research, 153: 163～173

Li X J, Zhang S C. 2006. *In vitro* differentiation of Neural precursors from human embryonic stem cells, Methods in Molecular Biology, 331: 169～177

Loebel D A, Watson C M, De Young R A. et al. 2003. Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells. Dev Biol, 264(1): 1～14

Maric D, Liu Q-Y, Grant G M et al. 2000. Functional ionotropic glutamate receptors emerge during terminal cell division and early neuronal differentiation of rat neuroepithelial cells. Journal of Neuroscience Research, 61: 652～662

Marting G. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma cells. Proc Natl Acad Sci USA, 78: 7634～7638

Ma W, Chen S, Fitzgerald W et al. 2005. Three-dimensional collagen gel networks for neural stem cell-based neural tissue engineering. Macromolecular Symposia, 227: 327～333

Ma W, Fitzgerald W, O'Shaughnessy T J et al. 2004. CNS stem and progenitor cell differentiation into functional neuronal circuits in three-dimensional collagen gels. Experimental Neurology, 190: 276～288

Ma W, Liu Q-Y, Maric D et al. 1998. bFGF-responsive telecephalic precursor cells express functional GABAA receptor/Cl^- channels *in vitro*. Journal of Neurobiology, 35: 277～286

Ma W, Maric D, Li B-S et al. 2000. Acetylcholine stimulates cortical precursor cell proliferation via muscarinic receptor activation and MAP kinase phosphorylation. European Journal of Neuroscience, 12: 1227～1240

McWhir J, Wojtacha D, Thomson A. 2006. Routine culture and differentiation of human embryonic stem cells. Methods Mol Biol, 331: 77～90

Mitalipova M, Palmarini G. 2006. Isolation and characterization of human embryonic stem cells. Methods Mol Biol, 331: 55～76

Nagy A, gocza E, Merentes Diaz E. et al. 1990. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. Development, 110: 815～821

O'Connor S M, Andreadis J D, Shaffer K M et al. 2000. Immobilization of neural cells in three-dimensional matrices for biosensor applications. Biosensors & Bioelectronics, 14: 871～881

O'Connor S M, Stenger D A, Shaffer K M. 2000. Primary neural precursor cell expansion, differentiation and cytosolic Ca^{2+} response in three-dimensional collagen gel. Journal of Neuroscience Methods, 102: 187～195

O'Connor S M, Stenger D A, Shaffer K M et al. 2000. Survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in three-dimensional agarose and collagen gel matrices. Neuroscience letter, 304: 189～193

O'Shaughnessy T J, Lin H J, Ma W. 2003. Functional synapse formation among rat cortical neurons grown on three-dimensional collagen gels. Neuroscience Letter, 340: 169～172

Owen M, Friedenstein A J. 1988. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. Ciba Found Symp, 136: 42～60

Piersma A H, Brockbank K G, Ploemacher R E et al. 1985. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. Exp Hematol. 13: 237～243

Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 284: 143～147

Roach M L, McNeish J D. 2002. Methods for the isolation and maintenance of murine embryonic stem cells. Methods Mol Biol, 185: 1～16

Schuldiner M. 2001. Induced neural differentiation of human embryonic stem cells. Brain Res, 913: 201～205

Schulz T C, Palmarinig M, Noggle S A et al. 2003. Directed Neuroal differertiation human embryonic stem cells. BMC Neurosciens, 4: 27

Sekiya I, Larson B L, Smith J R et al. 2002. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. Stem Cells, 20: 539～534

Shin S, and Stice S L. 2006. Long-Term proliferation of human embryonic stem cells-derived neuroepithelial cells. Stem Cells, 24: 125～138

Solter D, Knowles B B. 1975. Immunosurgery of mouse blastocyst. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 5099～5102

Sonntag K C, Pruszak J, Yoshizaki T et al. 2007. Enhanced yield of neuroepithelial precursors and midbrain-like dopaminergic neurons from human embryonic stem cells using the bone morphogenic protein antagonist noggin. Stem Cell, 25: 411～418

Terszowski G, Waskow C, Conradt P et al. 2005. Prospective isolation and global gene expression analysis of the erythrocyte colony-forming unit (CFU-E). Blood, 105(5): 1937～1945

Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S et al. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, 282: 1145～1147

Williams R L, Hilton D J, Pease S et al. 1998. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. Nature, 336: 684～687

Wu Y Y, Mujtaba T, Rao M S. 2002. Isolation of stem and precursor cells from fetal tissue. Methods Mol Biol, 198: 29～40

Zhang S C, Wernig M, Duncan I Det al. 2001. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol, 19: 1129～1133

第12章　流式细胞术

流式细胞术（flow cytometry，FCM）是20世纪70年代发展起来的一种利用流式细胞仪对悬液中的单个细胞、生物粒子进行快速测量并自动分析的技术。它综合了激光、计算机、流体力学、细胞化学、图像分析等多领域技术，是一门综合性的高科技生物分析技术。它的主要特点是：可以在单细胞水平上对大量细胞进行快速、准确、多参数的定量分析及分选，借此判断细胞的体积、DNA含量、蛋白质含量、酶活性、细胞膜受体和表面抗原等许多重要参量；可在无菌状态下，对活细胞进行分类收集，收集的纯度可达99%。近年来随着激光技术、荧光染料和单抗技术的发展，流式细胞仪在同一个细胞中同时测得多种参数的分析能力得到大大提高。由于此项技术具有多信息分析和高纯度分类的优点，已被广泛应用于细胞生物学、细胞遗传学、免疫学、酶学、肿瘤学及血液学等多个学科。本章将从流式细胞仪的结构、工作原理、用途、标本制作以及实例分析等方面来介绍这项技术。

12.1　流式细胞仪的结构、工作原理及应用

【基本结构】

流式细胞仪主要由四部分组成：流动室和液流系统、激光光源和光学系统、光电管和检测系统、计算机和分析系统（图12-1）。

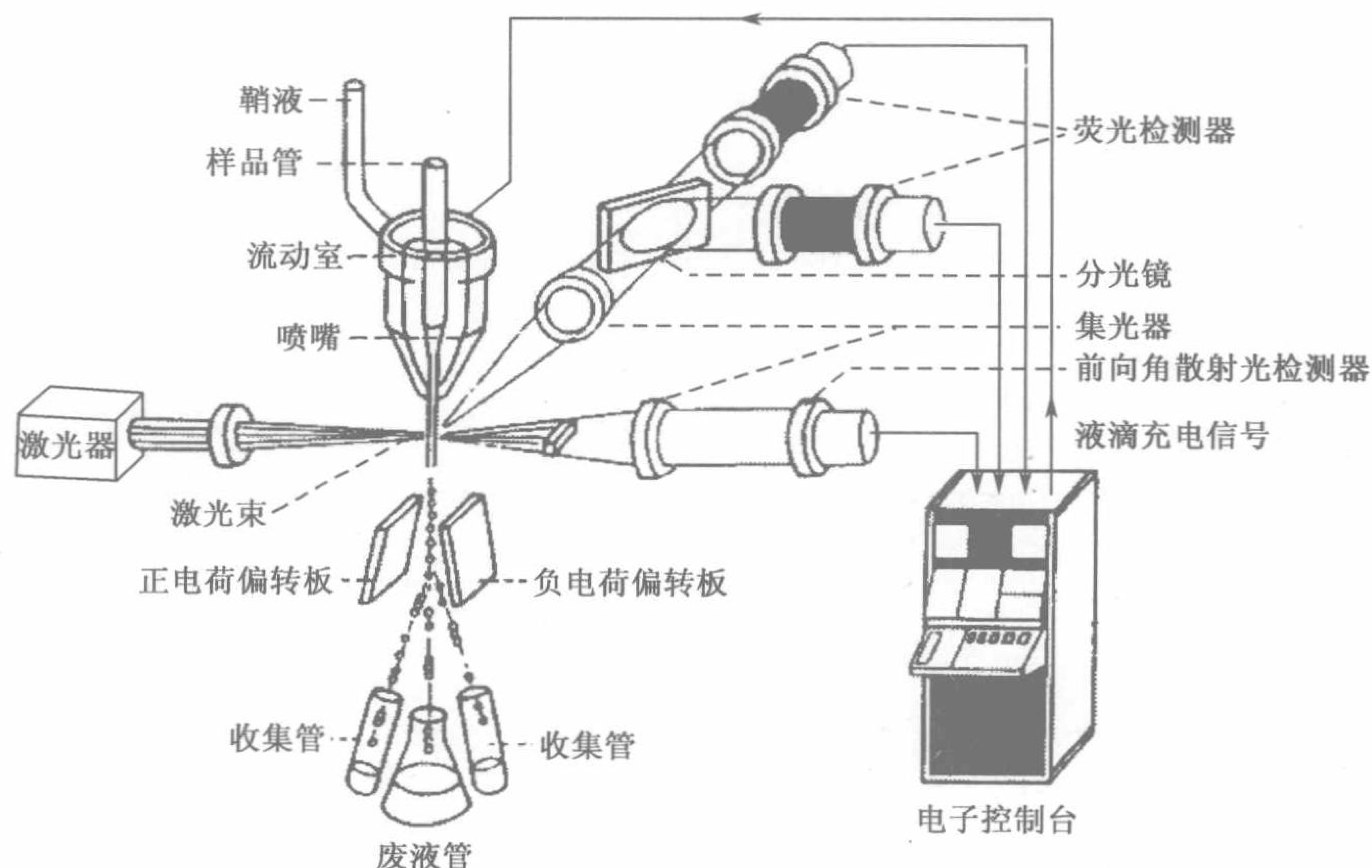


图12-1　流式细胞仪示意图

（1）流动室和液流系统：流动室由样品管、鞘液管和喷嘴等组成，主要由石英玻璃

制成，是液流系统的心脏。样品管贮放样品，单个细胞悬液在液流压力作用下从样品管射出；鞘液由鞘液管从四周流向喷孔，包围在样品外周后从喷嘴射出。为了保证液流是稳液，一般限制液流速度 $v<10$ m/s。流动室上方置有使液流破碎成液滴的超声震荡器。

(2) 激光光源和光学系统：流式细胞仪主要测定的信号荧光是由激发光激发的，常用的光源有弧光灯和激光；激光器又以氩离子激光器为普遍，也有配氪离子激光器或染料激光器的。光源的选择主要根据被激发物质的激发光谱而定。汞灯是最常用的弧光灯，其发射光谱大部分集中于 300～400 nm，很适合需要用紫外光激发的场合；氩离子激光器的发射光谱中，绿光 514nm 和蓝光 488nm 的谱线最强，约占总光强的 80%；氪离子激光器光谱多集中在可见光部分，以 647nm 较强；免疫学上使用的一些荧光染料激发光波长在 550nm 以上，可使用染料激光器。

(3) 光电管和检测系统：经荧光染色的细胞受合适的光激发后所产生的荧光是通过光电转换器转变成电信号而进行测量的。光电倍增管（PMT）最为常用。从 PMT 输出的电信号较弱，需要经过放大器放大后才能输入分析仪器。

(4) 计算机和分析系统：经放大后的电信号被送往计算机分析器，由多道分析器出来的信号再经模-数转换器输往微机处理器编成数据文件，或存储于计算机的硬盘和软盘上，或存于仪器内以备调用。计算机的存储容量较大，可存储同一细胞的 6～8 个参数。存储于计算机内的数据可以在实测后脱机重现，进行数据处理和分析，最后给出结果。

【工作原理】

将待测样品制备成单细胞或颗粒悬液，经特异性荧光染料染色后放入样品管中。样品悬液在气体的压力下进入充满鞘液的流动室，被鞘液约束后细胞排成单列由流动室的喷嘴喷出，形成细胞流。后者与入射的激光束垂直相交，液柱中的细胞被激光激发产生荧光。将一系列信号，如荧光、光散射、光吸收等经光学系统（透镜、光阑、滤片和检测器等）收集后，再经计算机系统收集、储存、分析并显示。选择不同的单克隆抗体及荧光染料，可对一个细胞同时进行多个参数检测。

流式细胞仪还可以对细胞进行分选。当含细胞的液滴逐个通过激光束时，受到两种检测器的检测：如果液滴中含有细胞就会激活干涉检测器，只有带有荧光标记细胞的液滴才会激活荧光检测器。当带有荧光标记的液滴通过激光束时，将两种检测器同时激活，引起液滴充电信号使鞘液带上负电荷。由于液滴带有负电荷，移动时就会向正极移动，进入到荧光标记细胞收集器中，分选纯度可达 99%以上。分选过程可在生理和无菌条件下进行，细胞可以继续保持活力，因此，分选得到的细胞可继续在体外培养，作进一步的研究。

【流式细胞仪的调试】

1. 调试的原则

FCM 是复杂精密的仪器，一般由专职技术人员操作、调试，以使其保持良好的工作状态，并能正确使用仪器。调试的原则是：得到较高的分辨率，即对某一特殊样品测得的变化常数 CV 值，CV 值越小越好；得到较高的灵敏度，即可测出最小荧光分子数。

调试仪器要有理想的标准品，其条件是：①稳定；②颗粒大小和荧光性要均匀；③标准品本身的CV值要低于仪器的CV值；④易得、易制成悬液。目前常用的标准品有两种：①荧光标记的塑料微球。常用的是异硫氰酸荧光素FITC和碱性罗丹明（rhodamine）；②戊二醛固定的鸡红血细胞（CRBC）。较多的实验室选用CRBC悬液。鸡红血细胞是椭圆形，血红蛋白可自发荧光，细胞悬液具有易得、制备方法简单、易于保存的特点。

2. 流式细胞仪的调试程序及要点

（1）调试和校准：调试的项目主要是激光强度、液流速度和测量区的光路等。此步多由工程师或专业操作人员完成，在这里不做详细叙述。

（2）仪器的操作和使用：①打开流式细胞仪；②打开联机电脑；③在气压阀减压的状态下确认鞘液桶充满，废液桶内有400ml漂白剂，并保证管路畅通；④气体阀置于加压位置，并排出管路中的气泡；⑤在样品管中加入去离子水，冲洗液流的喷嘴系统；⑥待机器预热5～10min后即可开始实验；⑦样品测量完毕后，再用去离子水冲洗液流系统；⑧ 打印所得检测结果。

【流式细胞仪的用途】

流式细胞仪定量分析及细胞分选技术已经广泛应用于细胞生物学基础研究，主要集中在以下几个方面：

（1）细胞群体异质性检测：根据细胞的内部和外部参量，利用流式细胞仪可对细胞总体的亚群或某一亚群的异质性进行多参数分析。

（2）单细胞水平上的多指标分析：包括细胞大小及内部结构分析；细胞表面、细胞器及细胞质的抗原分析；总DNA及RNA成分测定；染色体内DNA分析；DNA合成速率测定；细胞内蛋白质、酶、膜受体、细胞表面抗原、多糖等物质的含量测定；细胞的活性测定；细胞膜电位、细胞内pH及细胞内钙离子测定；细胞膜的流动性或微黏度分析等。

（3）细胞分选：根据细胞的内部或外部参量，分选出特定的细胞群体或生物微粒。例如，在遗传学中用双荧光素标记分离高纯度的X或Y染色体；应用单克隆抗体技术进行淋巴细胞及其亚群分析；淋巴细胞免疫分型；检测细胞因子；用DNA和RNA双染色法可以分离不同细胞周期时相的细胞等。在无菌状态下，分类收集的活细胞能保持良好的活力，因此可继续在体外培养或用于临床治疗。

（4）流式细胞仪在临床检测中也发挥了重要作用，如①检测肿瘤细胞增殖周期、肿瘤细胞表面标记、癌基因表达产物、进行多药耐药性分析、检测凋亡；②白血病和淋巴瘤细胞、活化血小板、造血干细胞（$CD34^+$）计数、白血病与淋巴瘤的免疫分型、网织红细胞计数、细胞移植的交叉配型和免疫状态检测等。

【常规检测样品制备方法】

（1）直接免疫荧光标记法：取一定量细胞悬液（约1×10^6个细胞/ml），直接加入标记有荧光素（FITC、PE等）的抗体进行免疫标记反应（如做双标或多标染色，可同时加入几种标记有不同荧光素的抗体），孵育20～30min后，用PBS（pH7.2～7.4）冲洗1～2次，加入缓冲液重悬，上机检测。本方法操作简便，结果准确，易于分析，适

用于同一细胞群多参数同时测定。

（2）间接免疫荧光标记法：取一定量的细胞悬液（约 1×10^6 个细胞/ml），封闭后，先加入特异的第一抗体，待反应完全后洗去未结合抗体，再加入荧光标记的第二抗体，生成抗原一抗体一抗抗体复合物，以 FCM 检测二抗上标记的荧光素被激发后发出的荧光。本法费用低，二抗应用广泛，多用于科研标本的检测。但由于二抗一般为多克隆抗体，特异性较差。故标本制备时应加入阴性或阳性对照。另外，由于此法步骤较多，增加了细胞丢失的可能，故不适用细胞数较少的标本测定。

（王旭平）

12.2　流式细胞仪检测细胞膜受体（直标法）

【实验原理】

细胞表面保留有较完整的抗原，用带有某种荧光标记（如 FITC、PE 等）的特异性单克隆抗体与细胞表面相应抗原结合，根据所测定的荧光强度或阳性百分率即可得知相应抗原的密度。

【实验用品】

（1）仪器：流式细胞仪、离心机、电冰箱、细胞培养设备；

（2）实验用品：细胞培养常规用品、离心管、流式仪上样管等；

（3）试剂：FITC 标记鼠抗兔 TLR4 单克隆抗体、同型对照抗体、PBS、固定液、细胞培养液等；

（4）实验材料：体外培养的兔心肌细胞。

【方法与步骤】

（1）取对数生长期细胞制备细胞悬液；

（2）PBS 离心清洗两次后，调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml；

（3）取 100μl 细胞悬液，加入 50 μl 正常山羊血清封闭 15～20 min；

（4）对照组和实验组细胞分别加入工作浓度同型对照抗体和 FITC 标记鼠抗兔 TLR4 单克隆抗体，充分振摇，室温避光孵育 20 min，PBS 洗涤（1000r/min，5min）2 次，每次加液 1 ml 左右；

（5）弃上清，加固定液 500μl（标本在试管中可保存 5~7 天）；

（6）流式细胞仪检测。

【观察与结果】

图 12-2 为流式细胞仪检测细胞膜表面 TLR4 受体直方图，纵坐标代表细胞数量，横坐标代表细胞荧光强度值。从图中可以看出，实验组细胞平均荧光强度（117.87）较阴性对照组（4.24）细胞高，表明该实验组细胞有所测 TLR4 受体的表达。

【注意事项】

（1）确保样品上机检测前的细胞浓度为 1×10^6 个/ml，细胞浓度过高或过低都会影响检测结果；

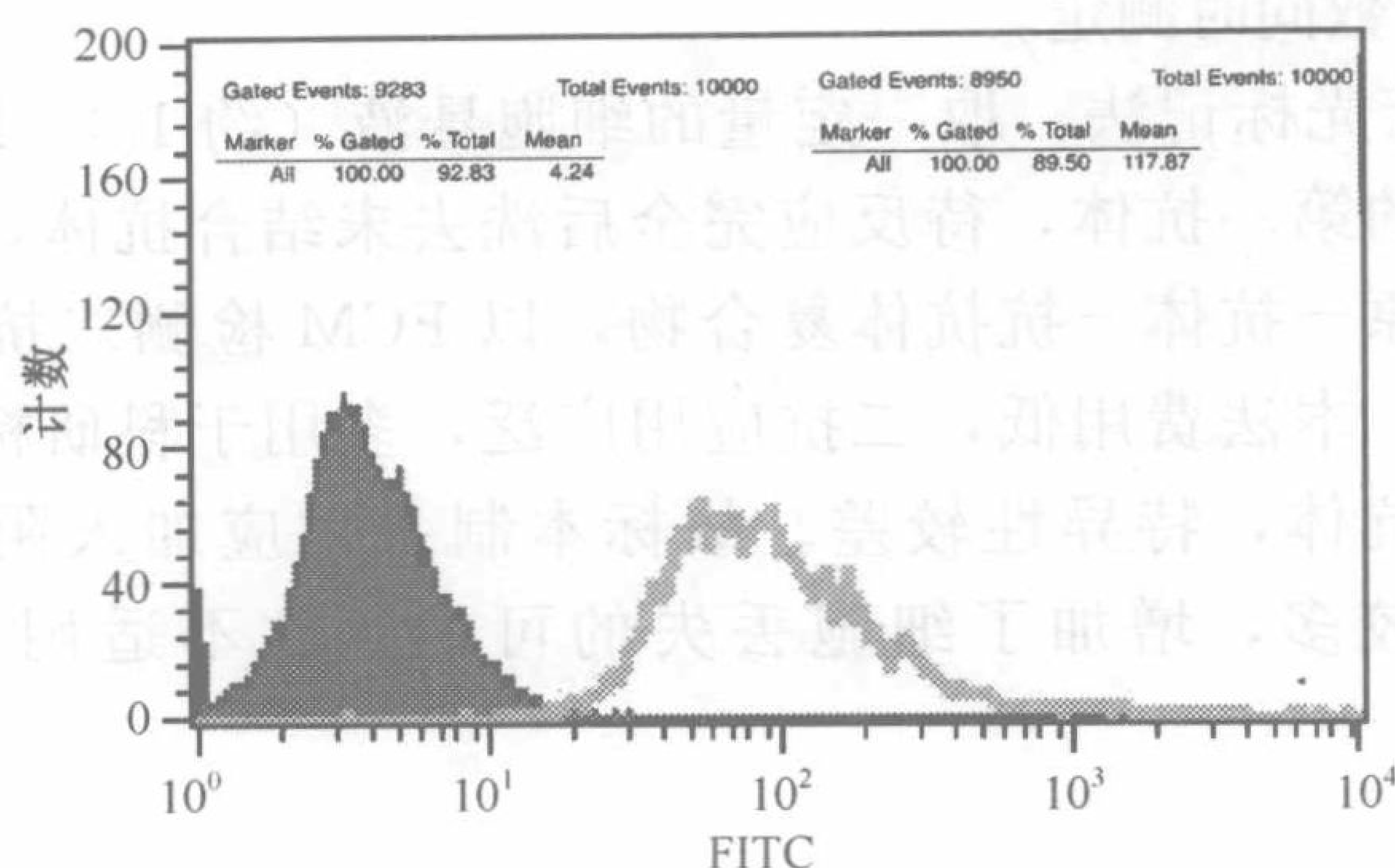


图 12-2　流式细胞仪检测兔心肌细胞 TLR4 受体直方图

(2) 设置对照样品，采用同型对照；

(3) 荧光抗体染色后要充分洗涤，注意混匀和离心速度，以减少重叠细胞和细胞碎片；

(4) 使用蛋白封闭剂，封闭非特异性结合位点，尤其在间接免疫荧光标记时必不可少。常用蛋白封闭剂为 0.5%牛血清白蛋白和 1%胎牛血清；

(5) 染色后注意避光，保证细胞免疫荧光的稳定；

(6) 判定结果时，应注意减去本底荧光。

【试剂配方】

甲醛固定液：

PBS	1000 ml (pH 7.2～7.4)
葡萄糖	20 g (终浓度 2%)
甲醛	10 ml
叠氮钠 NaN_3	0.2 g (终浓度 0.02%)

(王旭平)

12.3　流式细胞仪同时检测细胞内和细胞外抗原

【实验原理】

当用流式细胞仪同时检测细胞内、外抗原时，需先标记膜抗原，固定后再用破膜剂或打孔剂将细胞膜破坏，然后以带有某种荧光标记（如 FITC、PE 等）的特异性抗体与待检细胞内抗原或受体结合，根据所测定的阳性百分率即可获得相应抗原或受体的表达情况（以全血为例）。

【实验用品】

(1) 仪器：流式细胞仪、离心机、混匀振荡器；

(2) 实验用品：离心管、流式仪上样管等；

(3) 试剂：标记淋巴细胞表面的 CD45 单抗（FITC 标记）、细胞内抗原标记抗体（PE 标记）、溶血素、固定剂（含 4%多聚甲醛的 PBS 溶液）、破膜剂、PBS、封闭液

[含 0.5%牛血清白蛋白（BSA）]；

（4）实验材料：人静脉血。

【方法与步骤】

（1）收集肝素钠抗凝的静脉血 500μl；

（2）加入封闭液 50μl，作用 15min，用于消除非特异性的结合染色；

（3）在全血（细胞浓度约 2×10^6 个/ml）中加入 CD45 单克隆抗体（按说明书要求浓度），混匀后室温暗处孵育 20 min；

（4）加入溶血素，室温暗处孵育 10 min，离心 500*g* 5min，弃上清；

（5）加入固定剂，室温暗处孵育 15 min，离心 500*g* 5min，弃上清；

（6）加破膜剂，室温暗处孵育 10 min，（剂量参照说明书），PBS 洗 2 次（500*g*，5min），弃上清；

（7）加入荧光标记的细胞内抗原特异性抗体后混匀，室温暗处孵育 30min，PBS 洗 2 次（500*g*，5min），加入 500μl PBS 上机检测。

【注意事项】

（1）使用肝素钠抗凝的真空采血管采血，不易采用肝素锂、EDTA 和 ACD 抗凝剂，否则会影响检测结果；

（2）操作过程中注意混匀和避光；

（3）设立阴性对照。

（王旭平）

12.4 流式细胞仪检测细胞凋亡（PI 单染色法）

【实验原理】

碘化丙锭（PI）可以与细胞内 DNA 和 RNA 结合，采用 RNA 酶将 RNA 消化后，通过流式细胞术检测到的与 DNA 结合的 PI 的荧光强度直接反映了细胞内 DNA 含量的多少。由于细胞周期各时相的 DNA 含量不同，通常正常细胞的 G_1/G_0 期具有二倍体细胞的 DNA 含量（2*N*），而 G_2/M 期具有四倍体细胞的 DNA 含量（4*N*），而 S 期的 DNA 含量介于二倍体和四倍体之间。因此，通过流式细胞术 PI 染色法对细胞内 DNA 含量进行检测时，可以将细胞周期各时相区分为 G_1/G_0 期、S 期和 G_2/M 期。凋亡细胞由于总 DNA 量降低，于正常 G_1/G_0 细胞群前出现一 DNA 低染细胞群，即 G_1 峰前出现亚二倍体峰，即凋亡细胞群。

【实验用品】

（1）仪器：流式细胞仪、离心机、电冰箱、细胞培养设备；

（2）实验用品：细胞培养常规用品、离心管、流式上样管、400 目筛网等；

（3）试剂：PI 染液、PBS 溶液、70%乙醇、细胞培养液、凋亡诱导剂大蒜素等；

（4）实验材料：人结肠癌 HT29 细胞。

【方法与步骤】

（1）体外培养的 HT29 细胞，分实验组和对照组，并用 20μg/ml 大蒜素对实验组

细胞诱导 12h；

（2）收集细胞，4℃条件下用 70％乙醇固定 20min（最长可存放 4 周）；

（3）PBS 清洗（1000r/min 5min）细胞两次，以除去固定液，用 PBS 调整细胞浓度为 2×10^7 个/ml；

（4）取细胞悬液 50μl 加入含 RNase A 的 PI 染液 500μl，4℃避光染色 20min；

（5）400 目筛网滤过后，上机检测。

【观察与结果】

在分析结果时，先排除成双或聚集的细胞以及发微弱荧光的细胞碎片。从图 12-3 中可以看出，对照组细胞分为 G_1/G_0 期、S 期和 G_2/M 期三个峰，而实验组在 G_1/G_0 期前出现一亚二倍体峰。如以 G_1/G_0 期所在位置的荧光强度为 1.0，凋亡诱导组细胞的亚二倍体峰的荧光强度为 0.45 左右。表明在大蒜素的诱导下人结肠癌 HT29 细胞有凋亡发生，其凋亡率为 10.05％（正常对照组细胞凋亡率为 0.00％）。

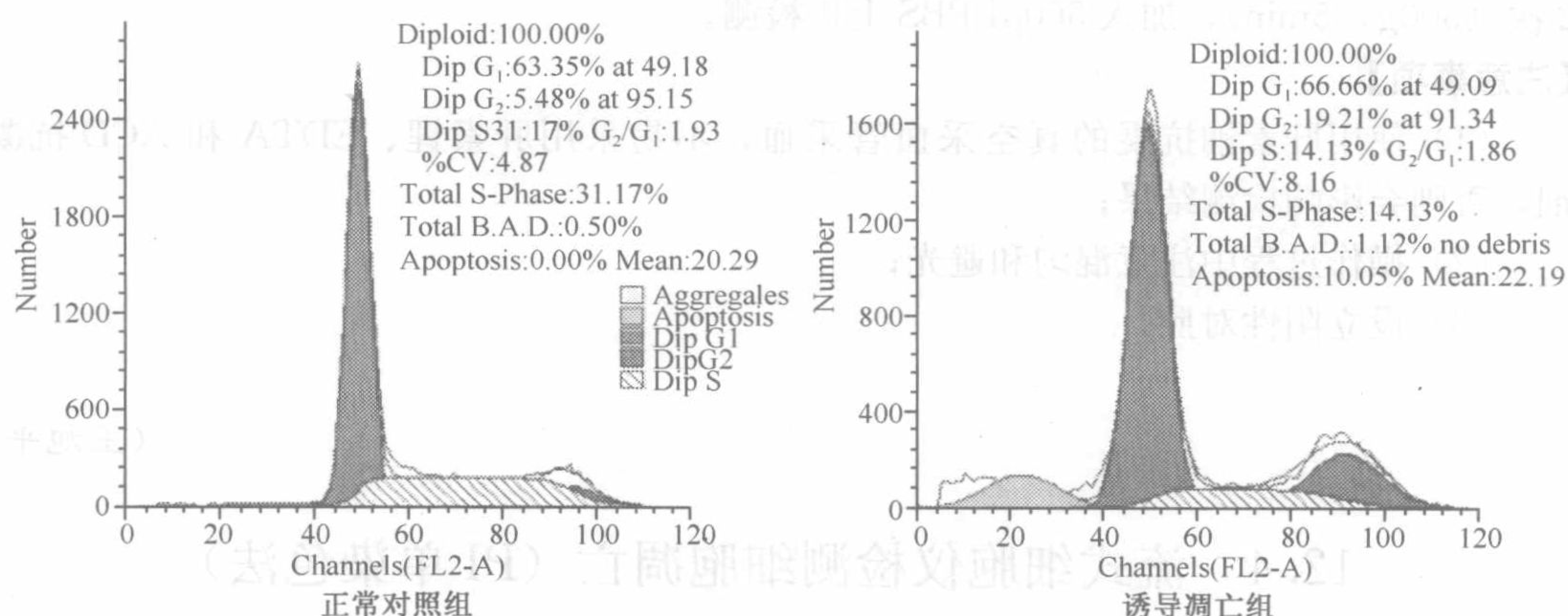


图 12-3　流式细胞仪检测大蒜素诱导的 HT29 细胞凋亡直方图

【注意事项】

（1）组织标本采集后要及时固定或深低温保存，以免组织发生自溶、DNA 降解，而造成测试结果的误差。

（2）要采用对组织细胞穿透性强的固定剂，70％的乙醇固定效果较好。对于有条件随时可以检测的标本，可尽量使用未经固定的新鲜样品。

（3）样品上样时要保证足够的细胞浓度，即 1×10^6 个/ml，杂质、碎片和重叠细胞应＜2％。

（4）细胞凋亡时，其 DNA 可染性降低被认为是凋亡细胞的标志之一，但这种 DNA 可染性降低也可能是因为 DNA 含量的降低，或者是因为 DNA 结构的改变使其与染料结合的能力发生改变所致。在分析结果时应予以考虑。

【试剂配方】

PI 染液（标记固定细胞）：

PI	10mg
RNase	10mg
PBS（pH 7.4）	加至 100ml

保存：4℃，避光。

PI染液（标记活细胞）：

生理盐水	32.4ml（或 NaCl 0.2916g）
PI	2.5mg
RNase	0.5mg
Triton X-100	0.25ml
加水至	50ml

保存：4℃，避光。

（王旭平）

12.5 流式细胞仪检测细胞凋亡和坏死（PI和 Annexin Ⅴ-FITC双染色法）

【实验原理】

在正常细胞中，磷脂酰丝氨酸只分布在细胞膜脂质双层的内侧，细胞发生凋亡早期，膜磷脂酰丝氨酸（PS）由脂膜内侧翻向外侧。Annexin Ⅴ是一种磷脂结合蛋白，与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力，故可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。因此 Annexin Ⅴ被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。在细胞发生凋亡时，膜磷脂酰丝氨酸外翻的发生早于细胞核的变化，而此阶段碘化丙锭不能通过细胞膜。细胞凋亡晚期坏死时，虽然也会发生磷脂酰丝氨酸外翻，但此时细胞膜的通透性明显增加，PI进入细胞与细胞核中的核酸结合，发出红色荧光。所以 Annexin Ⅴ-FITC（绿色荧光）常与鉴定细胞死活的核酸染料 PI（红色荧光）合并使用，来区分凋亡与坏死细胞。

【实验用品】

（1）仪器：流式细胞仪、离心机、电冰箱、细胞培养设备。

（2）实验用品：细胞培养常规用品、离心管、流式仪上样管、400目筛网等。

（3）试剂：结合缓冲液（晶美公司）、标记液1：将 AnnexinⅤ-FITC加入到孵育缓冲液中，终浓度为1μg/ml；标记液2：将 PI加入到孵育缓冲液中，终浓度为2μg/ml；细胞诱导剂脂多糖 LPS（10μg/ml）。

（4）实验材料：体外培养的人脐静脉内皮细胞。

【方法与步骤】

（1）体外培养人脐静脉内皮细胞，分为正常对照组和实验组，实验组细胞加入 LPS（10μg/ml）诱导24h；

（2）收集细胞，并调整细胞浓度为 1×10^7～5×10^7 个/ml；

（3）用4℃预冷结合缓冲液洗涤（1000r/min，5min）2次；

（4）取250μl结合缓冲液重悬细胞，并使其浓度为 1×10^7 个/ml；

（5）取100μl细胞悬液于5ml流式管中，加入5μl Annexin Ⅴ-FITC和10μl 20 μg/ml的PI溶液，室温下避光孵育15min；

（6）在反应管中加入 400μl PBS；

（7）流式细胞仪分析：流式细胞仪激发光波长用 488nm，用一波长为 515nm 的通带滤器检测 FITC 荧光，另一波长大于 560nm 的滤器检测 PI。

【观察与结果】

凋亡细胞对所有用于细胞活性鉴定的染料如 PI 有抗染性，坏死细胞则不具备这种特性。细胞膜有损伤时细胞的 DNA 可被 PI 着染产生红色荧光，而细胞膜保持完好的细胞则不会有红色荧光产生。因此，活细胞对 PI 拒染；早期凋亡细胞因其细胞膜完整也不能被 PI 着色；晚期凋亡和坏死细胞由于细胞膜受损，可被 PI 着染，激发后呈红色荧光。在双变量流式细胞仪的散点图上，左下象限为（FITC－/PI－）的活细胞；右上象限为（FITC＋/PI＋）胞膜受损细胞，即晚期凋亡和坏死细胞；而右下象限为（FITC＋/PI－）的早期凋亡细胞。可以根据检测得到的各象限的细胞百分比数据分析实验结果（图 12-4）。

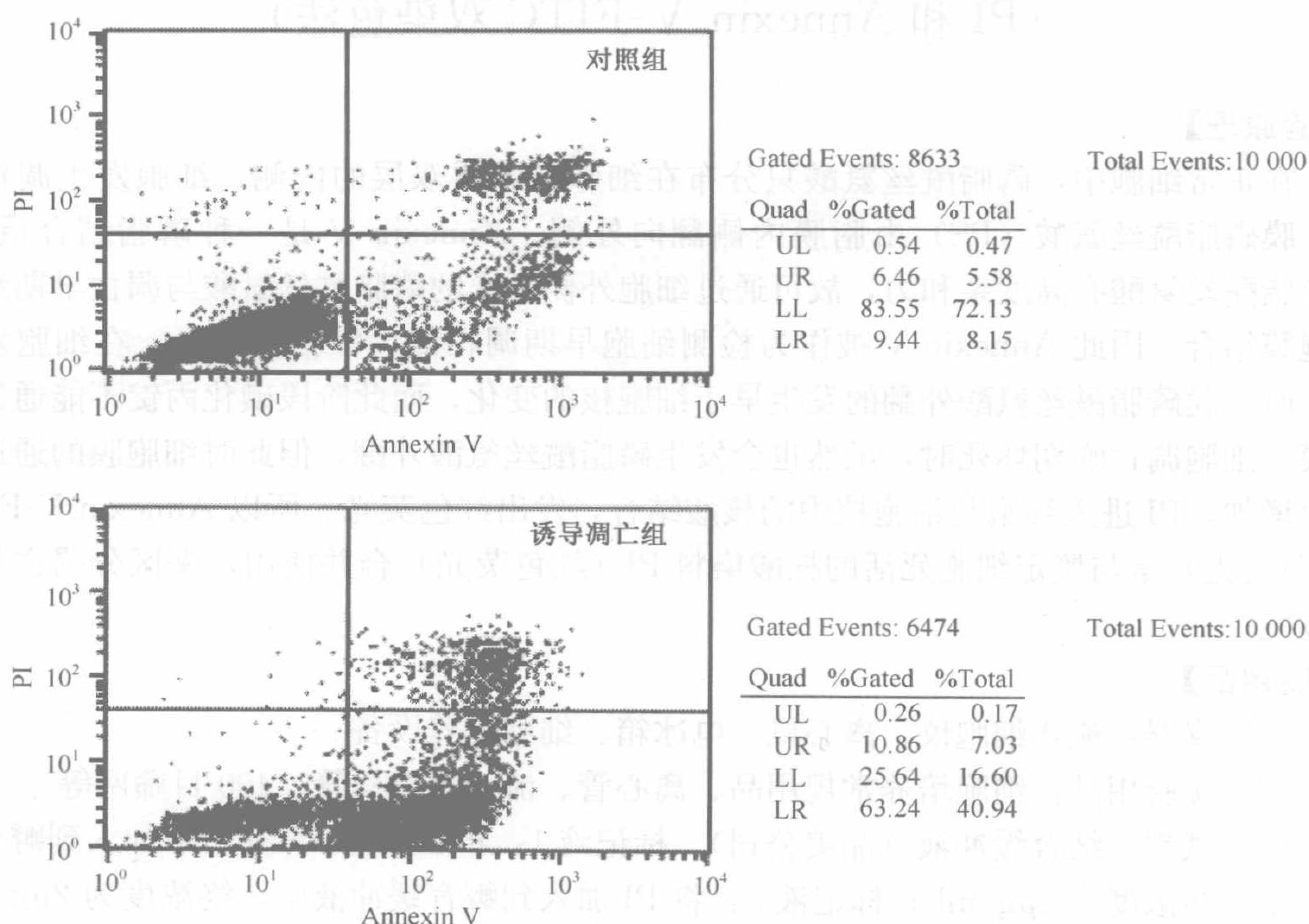


图 12-4 流式细胞仪检测 LPS 诱导下人脐静脉内皮细胞的活性变化散点图

【注意事项】

（1）AnnexinⅤ-FITC 和 PI 应避光保存；

（2）PI 有毒，操作时应注意要戴手套；

（3）因检测细胞的类型、凋亡诱导剂的种类、使用检测仪器不同，因此流式检测的荧光补偿也不同，因此每次检测均需使用未经凋亡诱导处理的细胞作为对照，进行荧光补偿的调节。

（王旭平）

12.6 流式细胞仪检测凋亡细胞内游离钙离子浓度变化

Fluo-3/Am是高度特异性的Ca^{2+}荧光指示剂，脂溶性Fluo-3/AM进入细胞后经非特异性酯酶脱去Am酯，成为水溶性的Fluo-3留在细胞内，与细胞内游离钙离子特异性结合后，其荧光强度是Fluo-3本身的40倍以上，当采用488nm激发光激发时，其荧光强度与细胞内游离钙离子浓度成正比，可以灵敏地反映细胞内游离钙离子浓度的变化。细胞凋亡时细胞内游离钙离子浓度急剧升高，因此可以利用流式细胞仪定量检测凋亡细胞内游离钙离子浓度变化。

【实验用品】

（1）仪器：流式细胞仪、离心机、细胞培养常规设备。

（2）实验用品：细胞培养常规用品

（3）试剂：荧光探针Fluo-3/AM溶液（1μg/μl）、谷氨酸溶液（40mmol/L）、PBS（pH 7.0）、0.125%胰蛋白酶、DMEM细胞培养液（含10%小牛血清）

（4）实验材料：体外原代培养2天的神经细胞

【方法与步骤】

（1）神经细胞体外原代培养于25cm²培养瓶中，原代培养36h时进行分组实验：设空白组、正常对照组和谷氨酸损伤组（每组两瓶）。损伤组中加入终浓度为2mmol/L谷氨酸，空白组、正常对照组不加。继续培养12h后收集细胞。

（2）收集细胞：吸出培养液，加入0.125%胰蛋白酶消化，2min后加等量培养液终止消化，1000r/min离心10min，移去上清液，PBS液漂洗、离心2遍后，去上清，用1ml PBS悬浮底层细胞。

（3）荧光探针标记：向正常对照组和谷氨酸损伤组细胞悬液中加入荧光探针Fluo-3/AM工作液（终浓度10μmol/L），37℃避光孵育1h（其间轻轻振荡几次，以保证Fluo-3/AM充分进入细胞内）后，PBS洗3遍，再用1ml PBS悬浮底层细胞后待测。空白组作为阴性对照不加荧光探针，其他处理同正常对照组和谷氨酸损伤组。

（4）流式细胞仪检测：随机测定单个神经元的荧光强度值（激发波长488nm），各组取10 000个神经细胞荧光强度值的平均值为测定值。

【观察与结果】

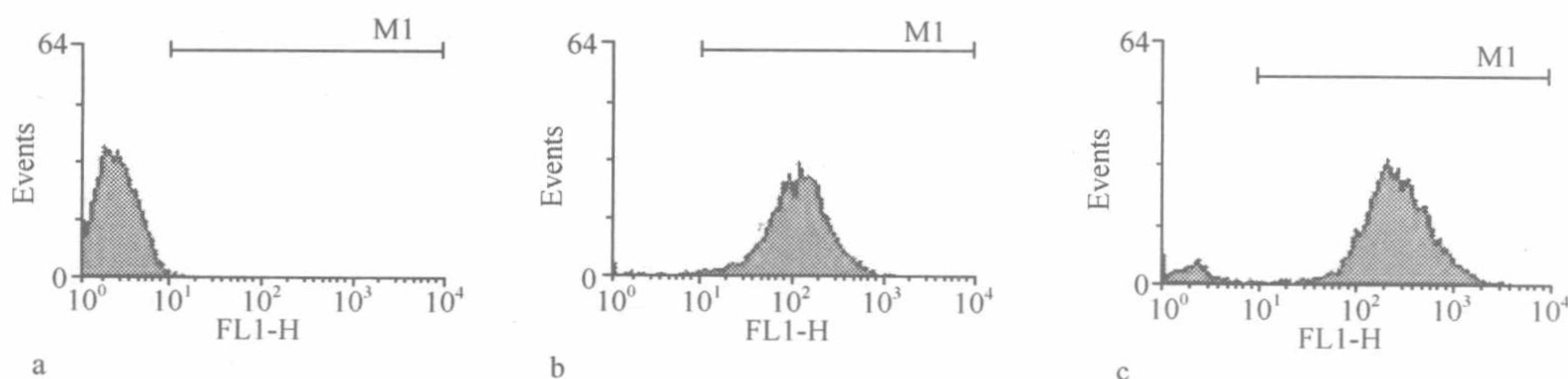


图12-5 流式细胞仪分析谷酸诱导的神经细胞内游离Ca^{2+}浓度变化直方图

a. 空白组（14.9）； b. 正常对照组（119.8）； c. Glu损伤组（269.6）；纵坐标代表细胞数量，横坐标代表细胞荧光强度值

谷氨酸可诱导神经细胞凋亡，使细胞内游离钙离子浓度升高，表现为荧光强度值升高。图 12-5 为流式细胞仪检测细胞内游离 Ca^{2+} 浓度直方图，显示与正常对照组相比较（119.8），Glu 损伤组荧光强度明显增强（269.6），为正常组的 2.25 倍，表明 Glu 能够引起神经细胞内游离 Ca^{2+} 的升高。

（刘鲁华　逯素梅）

参 考 文 献

努纳兹．2005．流式细胞术原理与科研应用简明手册．北京：化学工业出版社．1～104

张吉林，宋玉国．2005．医学分子生物学实验指导．北京：中国医药科技出版社．27～46

王书奎，周振英．2004．实用流式细胞术彩色图谱．上海：第二军医大学出版社．3～42

Howard M Shapiro．2003．Practical Flow Cytometry．Wiley．101～221

BD ACSCalibur Flow Cytometer Reference Manual．BD．105～203

FACSCalibur 中文培训手册．BD 公司．Page2：1～11

陈平．2002．不同频率电磁场对胆囊癌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响．同济大学学报（医学版），23（6）：455～457

宋平根．1992．流式细胞术的原理和应用．北京：北京师范大学出版社．78～83

